

# THESE

*Présentée par*

**Carlos GONZALEZ-HERNANDEZ**

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER-GRENOBLE I

SPECIALITE BIOLOGIE

(Arrêté ministériel du 5 juillet 1984)

## **ETUDE DES MECANISMES DE L'ENDOCYTOSE CHEZ DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM.**

Caractérisation des effets inhibiteurs de la caféine et de la cycloheximide.  
Analyse du pH endosomal.

Soutenue le 20 décembre 1991, devant la Commission d'Examen

### **JURY**

Président : M. J. PELMONT

Examineurs : MM. J. PHILIPPOT  
M. SATRE  
P.V. VIGNAIS

Thèse préparée au sein du Laboratoire de Biologie Cellulaire  
Département de Biologie Moléculaire et Structurale/URA 1130 CNRS  
Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble

*Ce travail a été réalisé au laboratoire de Biologie Cellulaire du Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble sous la direction de Monsieur Satre que je remercie pour l'accueil et l'intérêt constant qu'il a porté à ce travail et pour tous les moyens qu'il a mis à ma disposition afin de réaliser cette thèse.*

*Je tiens à remercier particulièrement Monsieur le Professeur Vignais de m'avoir accueilli dans le laboratoire de Biochimie en 1987.*

*Je remercie Monsieur le Professeur Pelmont d'avoir bien voulu accepter la présidence de cette Commission d'Examen.*

*A Monsieur le Professeur Vignais et Monsieur Philippot j'exprime ma reconnaissance pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger ce travail.*

*Je remercie également mes collègues de laboratoire pour les conseils, la bonne ambiance de travail qu'ils ont réussi à créer et pour l'aide qu'ils m'ont toujours apportée.*

*Mes remerciements amicaux aux équipes de Biochimie et Biochimie Microbienne.*

*Pendant la préparation de cette thèse, j'ai bénéficié d'une bourse du Conseil National de la Science et la Technologie du Mexique (CONACYT), dans le cadre du XI programme CEFI-CONACYT.*

## SOMMAIRE

	page No.
Liste des principales abréviations	1
Liste des figures et des tableaux	2
Résumé	5
<b>1. <u>Introduction.</u></b>	6
<b>2. <u>Matériel et Méthodes</u></b>	
2.1 Culture des amibes <i>Dictyostelium discoideum</i>	15
2.2 Différenciation de <i>Dictyostelium</i>	16
2.3 Viabilité cellulaire	17
2.4 Synthèse chimique du FITC-dextran	18
2.5 Mesure de la pinocytose de phase-fluide avec le FITC-dextran	18
2.6 Mesure de la phagocytose	20
2.7 Sécrétion des enzymes lysosomales	21
2.8 Mesure du pH endosomal	21
2.9 Dosages enzymatiques	29
2.10 Détermination de l'ATP et de l'ADP par la méthode de la luciférine-luciférase	29
2.11 Mesure de la concentration intracellulaire de caféine	31
<b>3. <u>La Pinocytose de phase-fluide chez <i>Dictyostelium</i>.</u></b>	
3.1 Introduction	32
3.2 Cinétiques de pinocytose de phase-fluide	33
3.3 Modèle cinétique à un compartiment	34
3.4 Effet de la température sur la pinocytose de phase-fluide	37
3.5 Cinétiques d'exocytose du FITC-dextran	39
3.6 Discussion	41
<b>4. <u>La caféine, un inhibiteur de l'endocytose     chez <i>Dictyostelium</i></u></b>	
4.1 Introduction	43

4.2 Effets de la caféine sur l'endocytose chez <i>Dictyostelium</i>	43
4.3 Inhibition de la croissance axénique	51
4.4 Effet sur la différenciation cellulaire	53
4.5 Effet du $\text{LaCl}_3$ sur la pinocytose de phase-fluide	54
4.6 Discussion	55
<b>5. <u>La cycloheximide, un inhibiteur de l'endocytose chez <i>Dictyostelium</i></u></b>	
5.1 Introduction	59
5.2 Effets de la cycloheximide sur l'endocytose chez <i>Dictyostelium</i>	60
5.3 Effet de la cycloheximide sur la croissance axénique	69
5.4 Effet d'autres inhibiteurs de la synthèse protéique sur la pinocytose de phase-fluide	70
5.5 Discussion	76
<b>6. <u>Le pH endosomal chez <i>Dictyostelium</i></u></b>	
6.1 Introduction	78
6.2 Le pH endosomal au plateau de la pinocytose	79
6.3 Le pH endosomal lors de cinétiques de pinocytose de phase-fluide	85
6.4 Le pH endosomal lors de cinétiques d'exocytose de FITC-dextran	86
6.5 Evolution spontanée du pH endosomal dans les étapes précoces de l'endocytose	88
6.6 Effet de la caféine et de la bafilomycine sur l'évolution du pH endosomal	91
6.7 Le pH endosomal dans des mutants de l'endocytose	92
6.8 Le pH endosomal lors de la différenciation cellulaire	95
6.9 Discussion	96
<b>7. <u>Conclusion</u></b>	99
<b>8. <u>Publications et Communications aux congrès</u></b>	102
<b>9. <u>Références bibliographiques</u></b>	103

## **LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS**

AMP, ADP, ATP	Adénosine-5'-mono,di, triphosphate
BSA	Albumine sérique bovine.
CCCP	Carbonyl cyanide m-chlorophényl-hydrazone.
DCCD	N,N'-dicyclohexylcarbodiimide
DIDS	Acide 4,4'-diisothiocyanato stilbene-2,2'-disulfonique
DMSO	Diméthyl sulfoxyde.
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine.
FITC-dextran	Isothiocyanate de fluorescéine couplé au dextran.
HEPES	Acide N-[2-hydroxyéthyl]-piperazine-N'-2-éthane sulfonique
HRP	peroxidase de raifort
MES	Acide 2-(N-morpholino)-éthane sulfonique.
MES-BSA	40 mM MES-Na, pH 6,5 contenant 0,05% (p/v) d'albumine sérique bovine.
MOPS	Acide 3-(N-morpholino)- propane sulfonique.
NaPi-TX100	0,1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -0,25% (p/v) Triton X-100.
NADPH-oxydase	Nicotinamide adénine di- nucléotide phosphate oxydase
NBD-Cl	7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole
NEM	N-éthylmaléimide
PIPES	Acide piperazine-N,N'-bis[2-éthane] sulfonique.
RMN	Résonance magnétique nucléaire.
rpm	Rotations par minute.
R(490/450)	Rapport de la fluorescence à des excitations de 490 et 450 nm.

## **LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX**

page No.

### **Introduction**

- Fig. 1.** Cycle multicellulaire de différenciation de *Dictyostelium* 7
- Fig. 2.** Représentation des voies d'endocytose 10

### **Matériel et Méthodes**

- Fig. 3.** Equilibres de protonation de la fluorescéine en solution aqueuse 22
- Fig. 4.** Spectres de fluorescence de FITC-dextran 23
- Fig. 5.** Courbe de calibration *in vivo* de FITC-dextran pour mesurer le pH endosomal 27
- Tableau 1.** Description des souches de *Dictyostelium discoideum* utilisées dans ce travail 16

### **La pinocytose de phase-fluide**

- Fig. 6.** Cinétiques de pinocytose de phase-fluide ajustées avec un modèle à un compartiment endosomal 34
- Fig. 7.** Graphique de l'équation d'Arrhenius pour la vitesse d'internalisation de FITC-dextran par l'amibe *Dictyostelium* 39
- Fig. 8.** Cinétique d'exocytose de FITC-dextran chez les amibes *Dictyostelium* 40
- Tableau 2.** Paramètres cinétiques de la pinocytose de phase-fluide chez l'amibe *Dictyostelium* en fonction de la température 38

### **La caféine**

- Fig. 9.** Inhibition de la pinocytose de phase-fluide par la caféine 44
- Fig. 10.** Titration de l'inhibition de la pinocytose de phase-fluide par la caféine 45
- Fig. 11.** Cinétique d'exocytose de FITC-dextran en présence de caféine 47

<b>Fig. 12.</b> Effet de la caféine et du vanadate sur le plateau de pinocytose	48
<b>Fig. 13.</b> Effet de la caféine sur la phagocytose des bactéries chez <i>Dictyostelium</i>	49
<b>Fig. 14.</b> Inhibition de la sécrétion de la phosphatase acide par la caféine	50
<b>Fig. 15.</b> Croissance des amibes <i>Dictyostelium discoideum</i> en présence de caféine	52
<b>Fig. 16.</b> Inhibition de la pinocytose de phase-fluide par le $\text{LaCl}_3$	54
<b>Tableau 3.</b> Pénétration de la caféine chez l'amibe <i>Dictyostelium</i>	46
<b>Tableau 4.</b> Effet de la caféine sur la différenciation cellulaire chez <i>Dictyostelium</i>	53
 <b><u>La cycloheximide</u></b>	
<b>Fig. 17.</b> Inhibition de la pinocytose de phase-fluide par la cycloheximide chez l'amibe <i>Dictyostelium</i>	60
<b>Fig. 18.</b> Titration de l'inhibition de la pinocytose de phase-fluide et de la croissance axénique chez <i>Dictyostelium</i>	61
<b>Fig. 19.</b> Cinétiques d'inhibition et de réversibilité de la pinocytose de phase-fluide par la cycloheximide	63
<b>Fig. 20.</b> Cinétiques d'exocytose du FITC-dextran en présence de cycloheximide	64
<b>Fig. 21.</b> Effet de la cycloheximide et du vanadate sur le plateau de la pinocytose	65
<b>Fig. 22.</b> Inhibition de la phagocytose chez <i>Dictyostelium</i> par la cycloheximide	66
<b>Fig. 23.</b> Cinétique d'inhibition de la sécrétion des enzymes lysosomales chez l'amibe <i>Dictyostelium</i>	68
<b>Fig. 24.</b> Effet de la cycloheximide sur la croissance de l'amibe <i>Dictyostelium</i> .	69
<b>Fig. 25.</b> Inhibition de la pinocytose de phase-fluide par la puromycine chez <i>Dictyostelium</i> , souche AX2	73
<b>Fig. 26.</b> Inhibition de la pinocytose de phase-fluide par la puromycine chez <i>Dictyostelium</i> , souche X6	75

<b>Tableau 5.</b> Mode d'action des antibiotiques qui inhibent la synthèse de protéines chez <i>Dictyostelium</i>	71
<b>Tableau 6.</b> Temps d'établissement et de récupération de l'inhibition de la pinocytose de phase-fluide chez <i>Dictyostelium</i> , AX2 en présence de divers inhibiteurs de la synthèse de protéines	72
<b>Tableau 7.</b> Inhibition de la pinocytose de phase-fluide et de la croissance axénique par des inhibiteurs de la synthèse de protéines chez l'amibe <i>Dictyostelium</i>	74
 <b><u>Le pH endosomal</u></b>	
<b>Fig. 27.</b> Influence du pH externe de mesure sur le pH endosomal	81
<b>Fig. 28.</b> Mécanisme de capture de bases faibles à l'intérieur des compartiments acides	82
<b>Fig. 29.</b> Effet du $\text{NH}_4\text{Cl}$ sur le pH endosomal chez l'amibe <i>Dictyostelium</i>	83
<b>Fig. 30.</b> Réversibilité de l'alcalinisation du pH endosomal provoquée par le $\text{NH}_4\text{Cl}$	84
<b>Fig. 31.</b> Le pH endosomal lors de cinétiques de pinocytose de phase-fluide	85
<b>Fig. 32.</b> Mesure du pH endosomal lors de cinétiques d'exocytose de FITC-dextran	87
<b>Fig. 33.</b> Evolution du pH endosomal lors des étapes initiales de l'exocytose	89
<b>Fig. 34.</b> Effet de la caféine sur l'évolution du pH endosomal lors des phases initiales de l'exocytose	91
<b>Fig. 35.</b> Effet de la bafilomycine sur l'évolution du pH endosomal lors des phases initiales de l'exocytose	92
<b>Fig. 36.</b> Evolution du pH endosomal lors de phases initiales de l'exocytose chez le mutant HGR5	93
<b>Fig. 37.</b> Mesure du pH endosomal et de la pinocytose de phase-fluide lors de la différenciation cellulaire	95
<b>Tableau 8.</b> Influence du pH du milieu d'incubation sur le pH endosomal	80



# **RESUME**

## **RESUME**

Dans ce travail, j'ai exploré les voies d'endocytose chez *Dictyostelium discoideum*. Les deux démarches suivies sont d'une part la caractérisation de deux inhibiteurs de l'endocytose qui ne modifient pas le métabolisme énergétique de la cellule : la caféine et la cycloheximide ; et d'autre part, l'exploration des compartiments acides de la voie endocyttaire.

Le FITC-dextran a été employé comme marqueur de phase-fluide, l'internalisation de ce marqueur est plus active dans un milieu nutritif que dans un milieu non-nutritif. Dans les deux cas, l'internalisation du marqueur de phase-fluide obéit à une cinétique biphasique avec une première phase d'internalisation linéaire en fonction du temps, suivie d'un plateau qui correspond à un équilibre dynamique entre l'entrée et la sortie de fluide. La pinocytose de phase-fluide est expliquée selon un modèle à un compartiment endocyttaire unique. L'activité pinocyttaire diminue avec une baisse de la température et l'énergie d'activation est de 27 kcal/mol.

La caféine, une méthylxanthine, inhibe fortement, et de façon immédiate, l'endocytose chez l'amibe *Dictyostelium* : la pinocytose de phase-fluide, la phagocytose ainsi que la sécrétion des enzymes lysosomales. La caféine est aussi un inhibiteur efficace de la croissance axénique dans la même gamme de concentration que celle qui inhibe l'endocytose. D'autres méthylxanthines comme la théobromine, la théophylline ou la paraxanthine n'ont aucun effet sur l'endocytose ou la croissance de *Dictyostelium*. L'hypothèse postulée pour expliquer l'effet inhibiteur de la caféine est une perturbation de l'homéostasie du  $Ca^{2+}$  intracellulaire.

La cycloheximide, inhibiteur de la synthèse protéique chez les eucaryotes, après une phase de latence d'environ 10 min, bloque toutes les voies endocytaires chez l'amibe *Dictyostelium discoideum*. Chez un mutant de *Dictyostelium* (souche X6, *cyc A1*) résistant à la cycloheximide, tous les phénomènes endocytaires sont résistants à l'action de cet antibiotique. D'autres inhibiteurs de la synthèse protéique des eucaryotes qui possèdent des modes d'action et des structures différents, tels que l'anisomycine, l'émétine, la pactamycine et la puromycine inhibent l'endocytose chez *Dictyostelium* d'une façon analogue à la cycloheximide. L'hypothèse postulée pour expliquer l'inhibition de l'endocytose par les inhibiteurs de la synthèse protéique fait intervenir un mécanisme régulateur lié à un changement de l'état de phosphorylation des protéines.

Le FITC-dextran utilisé comme sonde de pH permet d'observer, au plateau de la pinocytose de phase-fluide, un compartiment endosomal à pH  $5,8 \pm 0,2$ . A ce stade, le pH endosomal est indépendant du pH externe. L'addition de bases faibles et autres agents comme la monensine et le CCCP diminue l'acidité du compartiment endosomal. Lors des cinétiques de pinocytose et d'exocytose (>15 minutes), le FITC-dextran sonde un compartiment endosomal majeur à pH 5,8. Le pH endosomal déterminé lors d'une carence nutritive reste constant à pH 5,8 pendant l'engagement de la différenciation. La détermination du pH endosomal pendant les 15 premières minutes de l'exocytose a permis de mettre en évidence une étape précoce de l'endocytose chez *Dictyostelium*. Cette étape précoce est interprétée comme un trafic vésiculaire qui impliquerait un compartiment de petite taille et plus acide que le compartiment endosomal majeur.

**MOTS CLES :** *Dictyostelium*/ endocytose/ caféine/ cycloheximide/ acidification

# INTRODUCTION

## INTRODUCTION

L'endocytose est le terme utilisé pour désigner le processus biologique par lequel une cellule eucaryote internalise du matériel extracellulaire suite à la formation de vésicules dérivées de sa propre membrane plasmique (De Duve et al., 1974 ; Steinman et al., 1983; Helenius et al., 1983; Goldstein et al., 1985; Wileman et al., 1985). Si quasi toutes les cellules ont une activité endocytaire, celle-ci est plus ou moins active selon les types cellulaires. Les modèles cellulaires qui ont été particulièrement étudiés sont, par exemple, les neutrophiles (Daukas et Zigmond, 1985 ; Simms et al., 1989), les macrophages (Geisow et al., 1981 ; Swanson et al., 1985), les fibroblastes (Van Deurs et al., 1984) et les amibes comme *Entamoeba histolytica* (Aley et al., 1984), *Acanthamoebae castellanii* (Hohman et Bowers, 1984, 1985) et *Dictyostelium discoideum* (Thilo et Vogel, 1980).

*Dictyostelium discoideum* est une amibe du sol que l'on appelle sociale et son cycle de vie est composé de deux phases, la phase végétative de croissance et la phase de différenciation cellulaire (Bonner, 1967 ; Loomis, 1975 ; Raper, 1984). L'amibe *Dictyostelium* est un organisme chez lequel l'endocytose est particulièrement active. Elle ne possède aucun transporteur dans sa membrane plasmique pour les nutriments comme les sucres ou les acides aminés. De ce fait, chez *Dictyostelium*, l'endocytose joue le rôle d'une fonction nutritive essentielle (Thilo, 1985; Clarke et Kayman, 1987; Vogel, 1987; Klein et al., 1988). Le programme de différenciation cellulaire est enclenché lorsque la nourriture vient à manquer. Environ  $10^5$  amibes forment un agrégat multicellulaire d'une taille d'environ 1 mm. Ce processus d'agrégation est modulé par l'émission de signaux pulsés d'AMPc. En réponse à la fixation sur des récepteurs de surface d'AMPc émis par une cellule entrant en jeûne, une cellule cible est stimulée et relaie le signal en synthétisant et sécrétant de nouvelles molécules d'AMPc qui vont propager le signal d'agrégation. Les cellules, toutes identiques au départ, se différencient en deux classes distinctes: des spores et des cellules qui forment une tige supportant la masse de spores. Les cellules-tiges meurent pendant ce processus ; par contre les spores sont résistantes à la chaleur et à la déshydratation. Quand les spores seront remises en présence de nourriture, elles germeront pour redonner des amibes. Ce cycle de différenciation dure normalement 24 heures et il est réversible jusqu'à l'étape de limaçon. En présence de nourriture, les cellules effacent leurs marqueurs de différenciation et récupèrent leur capacité de croissance. Une caractéristique importante du programme de différenciation cellulaire est la diminution de l'activité endocytaire (Maeda, 1983). Une diminution de l'endocytose est observée aussi au cours de la mitose dans les cellules eucaryotes supérieures (Berlin et Oliver, 1980) et chez *Dictyostelium* (Maeda, 1988). Tuomikoski et al. (1989) ont montré que la fusion de

vésicules d'endocytose obtenues à partir de cellules BHK ("baby hamster kidney cells") est inhibée par des extraits mitotiques de *Xenopus*. Ces résultats ont été interprétés dans le sens d'un contrôle de l'endocytose par la protéine p34<sup>cdc2</sup>, une kinase impliquée dans la régulation du cycle cellulaire.

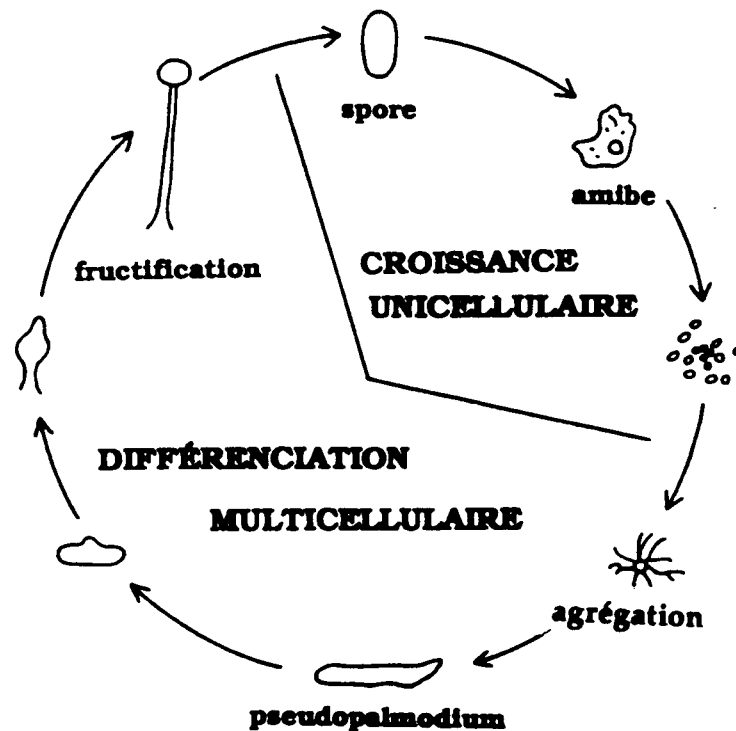


Fig. 1. Cycle multicellulaire de différenciation de *Dictyostelium*. (D'après Loomis, 1975)

Dans le processus d'endocytose, on distingue la phagocytose de particules solides, l'endocytose à récepteurs et la pinocytose de phase-fluide.

### La phagocytose

La phagocytose est l'internalisation par la cellule d'éléments solides, par exemple des bactéries ou des billes de latex, etc.... La phagocytose est une activité des cellules spécialisées comme les amibes, les macrophages, et les neutrophiles et joue pour ces derniers types cellulaires un rôle central contre l'invasion de microorganismes (Gabay,

1988). La phagocytose est un processus doté de sélectivité et activé par des particules fixées sur la membrane plasmique. Chez les macrophages et les neutrophiles, la reconnaissance des particules phagocytées s'effectue par des récepteurs à la surface cellulaire, des récepteurs Fc des immunoglobulines ou par des récepteurs du système du complément. Ces cellules peuvent également fixer des particules par la reconnaissance des résidus mannose ou fucose à la surface de la particule internalisée (pour revue Horwitz, 1988).

Après l'étape de reconnaissance, les particules étrangères à la cellule sont internalisées dans une invagination de la membrane plasmique qui entraîne la formation du phagosome. Le phagosome ainsi formé va fusionner avec des lysosomes (Horwitz and Maxfield, 1984 ; Geisow et al., 1981). Les lysosomes déversent leurs enzymes protéolytiques à l'intérieur du phagosome, la vésicule résultant de cette fusion est le phagolysosome qui est une vésicule riche en enzymes hydrolytiques. Divers travaux ont montré que le phagosome subit une acidification progressive avant de fusionner avec les lysosomes (McNeil et al., 1983 ; Lukacs et al., 1990). Chez les eucaryotes supérieurs, la fonction microbicide de ces cellules spécialisées, comme les neutrophiles et les macrophages, conjugue l'action des enzymes hydrolytiques avec des mécanismes dépendants de l'oxygène. L'activation d'une NADPH-oxydase aboutit à la production de formes activées de l'oxygène comme l'ion superoxyde (pour revue, Gabay, 1988).

Les souches sauvages de *Dictyostelium* qui vivent dans le sol se nourrissent des bactéries de l'humus. Au laboratoire, *Dictyostelium* se nourrit par phagocytose de bactéries telles *Escherichia coli* ou *Klebsiella aerogenes* et croissent avec un temps de doublement de 3-4 heures (Loomis, 1975).

Chez *Dictyostelium*, la reconnaissance et la fixation des particules à la surface cellulaire s'effectuent par deux mécanismes parallèles (Vogel et al., 1980). Un récepteur de type lectine spécifique du résidu de glucose est responsable de l'internalisation par exemple de bactéries comme la souche B/r de *E. coli*. D'autres récepteurs "non-spécifiques" permettent la fixation des particules par des interactions hydrophobes. Ce deuxième récepteur est responsable de l'internalisation de particules variées : érythrocytes, levures, bactéries, billes de latex. Des mutants des récepteurs phagocytaires de *Dictyostelium* ont été isolés (Duffy et al., 1984).

## **L'endocytose à récepteurs**

Dans l'endocytose à récepteurs, les ligands sont internalisés par la cellule par leur fixation aux récepteurs de la surface de la membrane plasmique. La fixation des ligands est une phase de concentration du ligand par rapport au milieu extérieur; elle est suivie par la formation d'une invagination de la membrane plasmique sous forme d'un puits mantelé, puis de la formation d'une vésicule recouverte de clathrine qui permet l'entrée du ligand dans la cellule. La double nature du ligand et de son récepteur vont déterminer le cheminement et le devenir intracellulaire (Steinman et al., 1983; Helenius et al., 1986; Goldstein et al., 1985). Chez *Dictyostelium*, Swanson et al. (1981) ont identifié une population de vésicules recouvertes de clathrine, néanmoins, leur rôle dans l'endocytose à récepteurs reste à établir. C'est un domaine qui fait l'objet de très nombreuses recherches et une analyse détaillée dépasse le cadre de ce travail.

## **La pinocytose de phase-fluide**

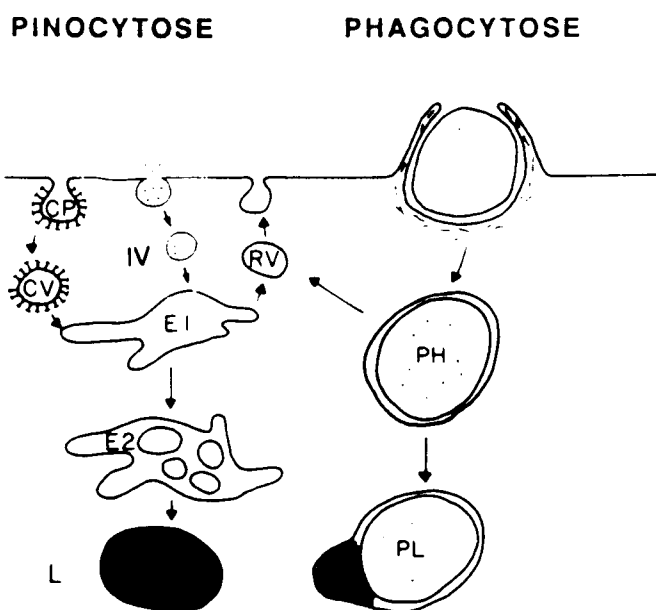
La pinocytose de phase-fluide correspond à une entrée de molécules dissoutes dans le fluide extracellulaire, qui se fait à la fois par une voie indépendante de la clathrine (Moya et al., 1985 ; Tran et al., 1987 ; Sandvig et al., 1987) mais aussi dans des vésicules recouvertes (Marsh et Helenius, 1980). Dans ce processus, le milieu extérieur est internalisé dans des vésicules d'une taille qui varie selon le type cellulaire (Thilo, 1985). La pinocytose de phase-fluide est considérée comme un processus constitutif, qui se fait en absence de stimuli externes. La quantité de substance internalisée est proportionnelle à la concentration des solutés dans le milieu environnant (Steinman et al., 1983).

Les souches axéniques de *Dictyostelium* ne dépendent plus exclusivement de l'ingestion de bactéries pour se nourrir. Elles sont capables de pousser par pinocytose de phase-fluide de milieu nutritif avec un temps de doublement d'environ 8 heures (Loomis, 1975). L'utilisation de souches axéniques permet d'obtenir des quantités importantes de matériel biologique homogène, une condition indispensable pour un travail de recherche .

Chez *Dictyostelium*, lors de la pinocytose de phase-fluide, le système vésiculaire est très vaste avec des vésicules d'un diamètre moyen de 0,2 à 0,3  $\mu\text{m}$  et riches en phosphatase acide (Ryter et de Chastellier, 1977 ; Thilo, 1985). Les vésicules recouvertes de clathrine identifiées chez *Dictyostelium* par Swanson et al. (1981) sont une population de diamètre 0,093  $\mu\text{m}$  présentes dans la phase végétative de croissance et dans l'étape

d'agrégation. O'Halloran et Anderson (1991) ont construit des cellules déficientes en clathrine. Leurs résultats préliminaires suggèrent que les vésicules recouvertes de clathrine sont impliquées dans la pinocytose de phase-fluide et dans la formation de la vacuole contractile, un organelle formé en réponse aux changements osmotiques.

La pinocytose de phase-fluide est un processus multidirectionnel qui permet, d'une part l'internalisation de fluide vers les compartiments terminaux de la voie endocytaire, et d'autre part, son recyclage vers la surface de la membrane plasmique, fait qui assure le renouvellement de cette membrane (Besterman et al., 1981 ; Steinman et al., 1983 ; Swanson et al., 1985). Les macrophages internalisent l'équivalent de leur membrane plasmique toutes les 30 minutes tandis que les fibroblastes font le même processus toutes les 2 heures (Steinman et al., 1983 ; Thilo, 1985). Chez l'amibe *Dictyostelium*, la pinocytose de phase-fluide est très active et les amibes internalisent un équivalent de la surface de la membrane plasmique toutes les 40-45 minutes (Thilo et Vogel, 1980; De Chastellier et al., 1983).



**Fig. 2. Représentation des voies d'endocytose** (D'après Mellman et al., 1986).  
Abréviations utilisées : CP, puis recouvert de clathrine ; CV, vésicule recouverte de clathrine ; IV, vésicule de la voie indépendante de la clathrine ; E1, endosome précoce ; E2, endosome tardif ; RV, vésicule de recyclage ; L, lysosome ; PH phagosome ; PL, phagolysosome.



## Le rôle des compartiments acides dans les voies d'endocytose

Une caractéristique essentielle des compartiments de la voie endocyttaire est leur pH acide. L'existence de compartiments maintenus à une valeur plus acide que le cytoplasme a été découverte il y a cent ans par Metchnikoff chez des protozoaires. Après cette découverte, plusieurs compartiments acides ont été trouvés chez des cellules eucaryotes. Ces compartiments font partie du système vésiculaire de la cellule, dans les voies d'endocytose ou de sécrétion (Anderson & Orci, 1988). Dans la voie d'endocytose, ces compartiments jouent des rôles importants dans la régulation de diverses fonctions (Helenius et al., 1983 ; Mellman et al., 1986) telles que l'accumulation de solutés, la dégradation de protéines et la dissociation du ligand du récepteur, le recyclage de récepteurs vers la surface de la cellule, la pénétration de certains virus, toxines et autres agents pathogènes et dans la fusion des différentes vésicules lors de la pinocytose (Merion et al., 1983). Certains microorganismes comme *Legionella pneumophila* (Horwitz et Maxfield, 1984), *Toxoplasma gondii* (Sibley et al., 1985) et *Mycobacterium avium* (Frehel et al., 1986) semblent capables d'empêcher les réactions d'acidification lors de la phagocytose, un fait qui joue un rôle important dans leur mécanisme de pathogénicité.

Les connaissances actuelles de la voie endocyttaire indiquent que les molécules internalisées traversent une série de compartiments acides prélysosomaux, les endosomes. Ces compartiments constituent une population d'éléments vacuolaires et tubulaires hétérogène en pH (Helenius et al., 1983 ; Mellman et al., 1986). Les endosomes constituent le moyen d'acheminement du matériel internalisé, soit vers le lysosome, soit dans une voie de recyclage vers la membrane plasmique. Les lysosomes sont l'étape terminale de l'endocytose et constituent une population de vésicules riches en hydrolases acides chargées de dégrader les macromolécules internalisées par endocytose (Kornfeld et Mellman, 1989). L'acidité des organelles du système endocyttaire est maintenue par des  $H^+$ -ATPases membranaires qui pompent des protons à l'intérieur de ces compartiments (pour revues voir Mellman et al., 1986 ; Rudnick 1986 ; Yamashiro et Maxfield, 1988). Chez *Dictyostelium*, Padh et al. (1989a) ont caractérisé une  $H^+$ -ATPase de type vacuolaire localisée dans des organelles appelées acidosomes responsables de l'acidification de la voie endocyttaire.

## La sécrétion des enzymes lysosomales

Les enzymes lysosomales sont synthétisées sur la membrane du réticulum endoplasmique sous la forme de précurseurs qui subissent une translocation vers la lumière du réticulum endoplasmique où elles sont glycosilées. Ces précurseurs se déplacent à différentes vitesses vers le Golgi où ils sont modifiés par l'addition des groupes phosphate et sulfate. La majorité des précurseurs sont acheminés vers les lysosomes où ils subissent un clivage pour donner les formes des enzymes matures qui peuvent être sécrétées dans le milieu extracellulaire d'une manière dépendante d'énergie (Cardelli et al., 1987 ; Kornfeld et Mellman, 1989).

La voie de sécrétion d'enzymes lysosomales est importante pour la compréhension du trafic vésiculaire parce qu'elle est étroitement associée aux voies d'endocytose (Anderson et Orci, 1988). La sécrétion d'enzymes lysosomales est très active dans différentes cellules, comme par exemple *Tetrahymena* (Banno et al., 1987 ; Hünseler et al., 1987) ou *Acanthamoebae castelani* (Hohman et Bowers, 1984) mais aussi dans les cellules eucaryotes supérieures comme les hépatocytes (Rosenfeld et al., 1982) ou les fibroblastes (Hasilik et Neufeld, 1980).

*Dictyostelium* possède une activité importante de sécrétion d'hydrolases lysosomales pendant la croissance axénique et les premières étapes de la différenciation. Les enzymes lysosomales sont sécrétées avec des caractéristiques qui varient selon leur type. La phosphatase acide est sécrétée moins rapidement que les glycosidases comme la N-acétylglucosaminidase, l' $\alpha$ -mannosidase, la  $\beta$ -glucosidase-1, l' $\alpha$ -glucosidase-1 et la  $\beta$ -galactosidase-1. Dimond et al. (1981) ont expliqué la différence de la sécrétion par une compartimentation différente entre les deux groupes d'enzymes. Récemment, Bush et Cardelli (1989) ont montré que les glycosidases ainsi que la phosphatase acide présentent la même localisation vésiculaire et suggèrent que la différence de la cinétique de sécrétion est due à des mécanismes de régulation différents.

## Les inhibiteurs de l'endocytose

Une stratégie employée pour l'étude de l'endocytose est l'utilisation d'inhibiteurs des voies endocytaires. Par exemple, des drogues qui agissent sur le cytosquelette ont été employées dans divers types cellulaires comme inhibiteurs de l'endocytose indépendante de la clathrine, par exemple, l'internalisation de la peroxidase du raifort (HRP) et du  $^3\text{[H]}$ -

saccharose est abolie par des agents qui empêchent la fonction des microfilaments comme les cytochalasines et par des inhibiteurs de microtubules comme la colchicine (Phaire-Washington et al., 1980 ; Pratten et Lloyd, 1979 ; Goldman, 1976). Récemment, Sandvig et van Deurs (1990) ont démontré que dans les cellules Vero, la cytochalasine D (10 µg/ml) ainsi que la colchicine (10 mM) inhibent l'endocytose du  $^{14}\text{[C]}$ -saccharose et du Lucifer Yellow sans inhiber l'endocytose de la transferrine. Chez *Dictyostelium*, Maeda et Kawamoto (1986) ont montré que le benzimidazole (50 µg/ml), un agent qui dépolymérise les microtubules, entraîne une inhibition modérée (d'environ 30%) de la pinocytose de phase-fluide dans un milieu non-nutritif ; la cytochalasine B, à une concentration de 50 µg/ml, provoque l'effet opposé.

Rossomando et al. (1981) ont employé l'hadacidine comme un inhibiteur de la pinocytose de phase-fluide chez *Dictyostelium*. L'hadacidine (N-formyl - N-hydroxy-glycine) est un analogue d'acide aminé qui inhibe la pinocytose de phase-fluide dans un milieu nutritif mais sans aucun effet en milieu non-nutritif. Les conclusions de ce travail suggèrent que *Dictyostelium* possède deux types d'activité endocytaire, une dépendante de la présence de nutriments dans le milieu extracellulaire et l'autre indépendante. Le mécanisme d'action postulé de l'hadacidine est une inhibition de la fusion des vésicules de pinocytose de phase-fluide avec les lysosomes.

### **But du travail**

Le but de ce travail a été l'exploration des voies endocytaires chez l'amibe *Dictyostelium*. Deux démarches ont été suivies pour approfondir la connaissance des voies d'endocytose, d'une part la caractérisation d'inhibiteurs spécifiques de l'endocytose ne modifiant pas le métabolisme énergétique de la cellule et d'autre part l'exploration des compartiments acides de la voie endocytaire.

Dans la première partie de mon travail, j'ai étudié en détail les cinétiques de pinocytose et d'exocytose en utilisant le FITC-dextran comme marqueur de phase-fluide. Dans la deuxième partie, je me suis appliqué à trouver et à caractériser des nouveaux inhibiteurs bloquant l'endocytose chez *Dictyostelium*. Deux nouveaux inhibiteurs de l'endocytose qui ne modifient pas le métabolisme énergétique de *Dictyostelium* ont été caractérisés, la caféine, un agent qui relâche le calcium intracellulaire, et la cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique chez les cellules eucaryotes.

Dans la troisième partie de mon travail, j'ai exploré les compartiments acides pendant les cinétiques de pinocytose et d'exocytose ainsi que pendant le programme de différenciation cellulaire en utilisant le FITC-dextran comme sonde de pH.

# **MATERIEL ET METHODES**

## 2.1 Culture des amibes *Dictyostelium discoideum*.

Les souches utilisées dans ces expériences sont la souche axénique AX2 dont la référence de l'American Type Culture Collection, (Rockville, MD., USA) est ATCC 24 397 et la souche mutante X6 résistante à la cycloheximide, qui nous a été fournie par le Professeur Keith Williams (Macquarie University, Sidney, Australie); leurs caractéristiques sont données dans le tableau 1. Les cultures des amibes sont réalisées dans un milieu nutritif dont la composition est la suivante (Watts & Ashworth, 1970):

Peptone(Oxoid).....	14,30 g/l
Extrait de levure (Oxoid).....	7,15 g/l
Maltose,H <sub>2</sub> O.....	18,00 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ,12 H <sub>2</sub> O.....	1,28 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,48 g/l
Dihydrostreptomycine sulfate.....	0,25 g/l

Ce milieu a un pH final de 6,5. Il est stérilisé à l'autoclave pendant 15 minutes à 120°C.

Les cultures de la souche X6 sont effectuées en milieu axénique en présence de 2 mM cycloheximide. Les cultures sont effectuées en aérobiose, obtenue par agitation rotative (170 rpm) à 21°C. Le volume des cultures n'excède pas un dixième du volume de l'erlenmeyer utilisé. La cycloheximide est éliminée du milieu de culture 20 heures avant de réaliser les expériences.

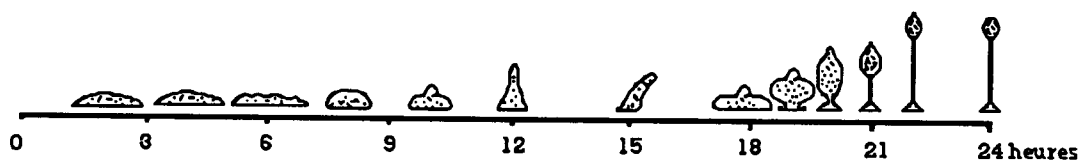
Le nombre de cellules et la distribution des tailles sont déterminés en utilisant un compteur de cellules Coulter (modèle ZM) couplé à un analyseur multi-canaux C256. Pour toutes les expériences réalisées, les cellules sont récoltées en phase exponentielle de croissance, pour la souche AX2 entre  $5 \times 10^6$  et  $1 \times 10^7$  cellules/ml, pour la souche X6 entre  $3 \times 10^6$  et  $5 \times 10^6$  cellules/ml.

**Tableau 1. Description des souches de *Dictyostelium discoideum* utilisées dans ce travail.**

Souche Parent(s)	Génotype	Références
AX2 NC4	<i>axeA2, axeB2, axeC2</i>	Watts et Ashworth, 1970
X6 TS12/NP2	<i>axeA1, axeB1, axeC1</i> <i>cycA1, tsgA1</i>	Katz et Sussman, 1972 ; Williams <i>et al.</i> , 1974a,b K.L. Williams (communication personnelle)

Dans les loci indiqués, les phénotypes des mutations sont les suivants : *axe*, croissance axénique; *cyc*, résistance à la cycloheximide; *tsg*, croissance sensible à la température.

## 2.2 Différenciation de *Dictyostelium*



Lorsque les amibes *Dictyostelium* sont privées de source nutritive à une interface air-eau, elles commencent leur cycle de différenciation en se modifiant en deux types cellulaires: les cellules spores et les cellules tiges. La technique développée par Sussman (1987) permet d'observer les différentes structures au long du programme de développement de *Dictyostelium*.

Deux papiers filtres Whatman 1 (diamètre du pore 80  $\mu$ m) sont placés dans une boîte de Petri, imbibés par environ 5 ml de tampon LPS (20 mM KCl ; 2,5 mM  $MgCl_2$ , 6  $H_2O$  ; 30 mM  $NaH_2PO_4$ ; 24 mM  $Na_2HPO_4$  ; 0,5 mg/ml Sulfate de (dihydro)streptomycine. Le pH est 6,5 - 6,8. L'excès de liquide est drainé. Ensuite, un filtre Millipore (HAWP diamètre 25 mm) est placé sur le papier filtre. Des amibes récoltées à partir du milieu axénique de croissance sont lavées à 4°C, deux fois par du tampon LPS

et remises en suspension dans le même tampon à  $1,2 \times 10^8$  cellules/ml. Un volume de 0,1 à 0,25 ml de la suspension d'amibes est étalé sur le filtre Millipore. Les cellules sont mises en incubation à 22°C dans une boîte en atmosphère humide pendant 36 heures.

### 2.3 Viabilité cellulaire

La viabilité des amibes *Dictyostelium*, après un traitement avec des inhibiteurs de l'endocytose, est déterminée par étalement d'une suspension d'amibes à la surface de boîtes de Petri contenant du milieu gélosé avec des bactéries *Klebsiella aerogenes* comme source nutritive (Sussman, 1987). Les amibes dont la viabilité est à tester sont comptées avec le Coulter. Le nombre d'amibes obtenu est la somme des cellules viables et non-viables; pour faire la différence entre les deux, la viabilité est mesurée de la façon suivante : les cellules sont mises en suspension à  $1-2 \times 10^7$  cellules/ml dans du tampon 17 mM Na-K phosphate, pH 6,3, glacé. Des dilutions sont effectuées de façon à avoir dans le volume à étaler (0,6 ml) entre 30 à 50 amibes viables. Cette dilution est étalée en même temps qu'une suspension dense de *Klebsiella aerogenes* en Na -K phosphate à la surface de boîtes de Petri (diamètre 100 mm) contenant 30 ml de milieu gélosé SM. *Klebsiella aerogenes* va se développer et forme un tapis bactérien à la surface du milieu gélosé. Chaque amibe viable va se multiplier et les nouvelles amibes vont phagocyter les bactéries. Après 3 à 4 jours d'incubation à 22°C, il apparaît des plaques claires dans le tapis de bactéries correspondant aux amibes viables qui ont phagocyté des bactéries et qui se sont multipliées. Le rapport du nombre de plaques sur le nombre de cellules étalées représente la fraction de cellules viables.

Composition du milieu gélosé de culture de *Dictyostelium* (SM).

Peptone(Oxoid).....	10 g/l
Extrait de levure (Oxoid).....	1,0 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	2,2 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1 g/l
MgSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O.....	1 g/l
Glucose.....	10 g/l
Agar Bacto (Bitek).....	15 g/l

Le pH est ajusté entre 6,9 et 7,2. Il est stérilisé à l'autoclave pendant 15 minutes. Quand le milieu est refroidi à 60°C les boîtes de Petri sont coulées.



## **2.4 Synthèse chimique du FITC-dextran.**

La synthèse chimique de FITC-dextran a été envisagée à la suite de la mise en évidence par Preston et al. (1987) d'impuretés de faibles poids moléculaires dans certains lots de FITC-dextran (FD 70S) provenant de chez Sigma . Le FITC-dextran est synthétisé selon la méthode de De Belder et Granath (1973) à partir de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) qui réagit, à température élevée, avec le dextran pour donner le o-(fluorescéinyl thiocarbamoyl)dextran (FITC-dextran).

Le dextran, 1 g, (T70, Pharmacia), est solubilisé dans 10 ml de diméthylsulfoxyde (DMSO) contenant 0,3 ml de pyridine et 20 mg de dibutylétain dilaurate (Fluka). Puis 100 mg de FITC (FITC isomère I, Fluka) sont ajoutés à la solution qui est maintenue à 95°C pendant 2 heures en agitation. Après refroidissement, le FITC-dextran est récupéré par précipitation avec une quantité minimale d'éthanol (environ 20 ml). Trois cycles de solubilisation par le DMSO et précipitation par l'éthanol sont effectués. Le précipité final est solubilisé dans l'eau (4 à 5 ml) et dialysé à 0-4°C contre deux litres d'eau distillée pendant 24 heures. Puis le contenu du sac de dialyse est lyophilisé. Le rendement de la synthèse est supérieur à 50 %. Le degré de substitution du FITC-dextran synthétisé est dans la gamme 0,004 et 0,010 (mol FITC/mol glucose).

Des résultats identiques ont été obtenus avec le FITC-dextran synthétisé au laboratoire et avec le FITC-dextran (FD 70) de Sigma. Nous n'avons pas utilisé le FITC-dextran FD 70S de Sigma dont la pureté avait été mise en cause.

## **2.5 Mesure de la pinocytose de phase-fluide avec le FITC-dextran.**

Le FITC-dextran (masse moléculaire moyenne 70000) est dissout à 20 mg/ml dans le milieu de pinocytose: tampon ou milieu axénique. Puis la solution est filtrée sur Millex-HA 0,45 µm. Cette solution est préparée extemporanément et maintenue à l'abri de la lumière.

Pour effectuer les expériences de pinocytose, les cellules récoltées sont centrifugées 4 minutes à 2400 rpm à 4°C. Pour les cinétiques dans un milieu non nutritif (tampon MES-Na), les cellules sont lavées deux fois avec du tampon 40 mM MES-Na, pH 6,5, glacé. Pour une cinétique en milieu axénique, l'ancien milieu est éliminé par centrifugation, 4 minutes à 2400 rpm à 4°C.

Les cinétiques de pinocytose sont faites avec des cellules remises en suspension à  $1 \times 10^7$  cellules/ml dans le milieu voulu. Les cellules sont agitées (170 rpm) pendant toute la cinétique à une température constante de 22°C. La cinétique de pinocytose est démarrée 10 à 15 minutes après la remise en suspension des cellules, par l'addition du FITC-dextran pour avoir une concentration finale de 2 mg/ml. L'évolution de la cinétique est suivie par des prélèvements de 1 ml en fonction du temps. La cinétique est stoppée pour chaque temps par dilution de l'échantillon prélevé dans 10 ml de tampon 40 mM MES-Na, pH 6,5-0,05% (p/v) BSA glacé (tampon MES-BSA). Les cellules sont lavées deux fois par du tampon MES-BSA en centrifugeant 4 minutes à 2400 rpm à 4°C. Les culots sont remis en suspension dans 1 ml de tampon 40 mM MES-Na, pH 6,5 à 0-4°C. Le nombre de cellules est compté en prenant des échantillons de 25 µl pour chaque prélèvement de la cinétique. Pour mesurer la quantité de FITC-dextran internalisée pendant la pinocytose, les cellules sont lysées par addition de 2 ml de tampon 0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,25% (v/v) Triton X-100, pH 10,5 (Tampon NaPi-TX-100).

La fluorescence du FITC-dextran est mesurée avec un fluorimètre Hitachi modèle F-2000 pour des longueurs d'onde d'excitation de 470 nm et d'émission de 520 nm. Les mesures sont corrigées par soustraction de la fluorescence d'échantillons provenant d'une incubation où le FITC-dextran est remplacé par du dextran. Pour déterminer les quantités de FITC-dextran internalisées, une courbe d'étalonnage est établie en ajoutant des quantités variables de FITC-dextran provenant du milieu d'incubation (0-10 µl) à des cuves de fluorescence contenant 2 ml de NaPi-TX100 plus 1 ml de tampon 40 mM MES-Na, pH 6,5. La courbe d'étalonnage est mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons de pinocytose.

L'exocytose du marqueur de phase-fluide, FITC-dextran, est déterminée avec des suspensions d'amibes à  $1 \times 10^7$  cellules/ml, qui ont été chargées préalablement avec 2 mg/ml de FITC-dextran pendant 2-3 h à 22°C, en milieu axénique ou en tampon 40 mM MES-Na, pH 6,5. Les suspensions sont ensuite lavées deux fois par du tampon MES-BSA à 0-4°C. Le culot est remis en suspension en milieu axénique ou en milieu non nutritif, sans FITC-dextran à 22°C. Les mesures cinétiques sont faites de la même façon que pour la pinocytose de phase-fluide.

## **2.6 Mesure de la phagocytose.**

Une première technique consiste à effectuer une mesure qualitative de la phagocytose en utilisant des particules carboxylées de latex. Les amibes *Dictyostelium* ont été récoltées par centrifugation et ensuite remises en suspension à  $2 \times 10^6$  cellules/ml en milieu axénique à 22°C en agitation (100 rpm) en présence éventuellement d'un composé dont l'effet sur la phagocytose est à tester. Des particules de latex (Sigma, 1 µm de diamètre) 5 µl /ml de suspension d'amibes, sont ajoutées au milieu d'incubation. Des photographies des cellules observées à un grossissement 400 x sous un microscope Zeiss inversé, équipé d'un Polaroid, ont été faites après 20 minutes d'incubation. Les cellules ayant phagocyté sont remplies de billes de latex et apparaissent plus sombres que les cellules n'ayant pas phagocyté.

La phagocytose est déterminée quantitativement par la méthode de Glynn (1981). Les amibes *Dictyostelium* utilisées pour ces expériences ont été récoltées en phase exponentielle de croissance en milieu axénique. Elles ont été lavées deux fois par du tampon 17 mM Na, K-phosphate, pH 6,2.

La souche de *E. coli* B/r a été marquée avec 1 µCi/ml d'un mélange d'acides aminés-[<sup>14</sup>C] par incubation pendant 12 heures dans un milieu M63 contenant 0,2 % (p/v) glucose (Miller, 1972). Les bactéries sont récoltées par centrifugation à 28000 rpm pendant 15 minutes, puis lavées deux fois par du tampon 17 mM Na, K-phosphate, pH 6,2, glacé (28000 rpm, 15 minutes). La quantité de bactéries a été déterminée par comptage des dilutions après étalement sur milieu gélosé SM. En fonction du lot, la radioactivité des bactéries a été entre 1000 et 1300 dpm/10<sup>6</sup> bactéries.

Les cinétiques de phagocytose sont réalisées à 23°C dans un tampon 17 mM Na-phosphate, pH 6,2 avec  $2 \times 10^8$  amibes/ml et  $2 \times 10^{10}$  bactéries/ml. L'évolution de la cinétique est suivie par des prélèvements de 1 ml de la suspension en fonction du temps. La cinétique est stoppée pour chaque temps par dilution de l'échantillon prélevé dans 10 ml du tampon 17 mM phosphate-Na-2 mM NaN<sub>3</sub>, pH 6,2, glacé et contenant  $1 \times 10^7$  amibes utilisées comme balast durant les centrifugations. Les amibes sont séparées des bactéries non phagocytées par lavage avec du tampon 17 mM Na, K-phosphate/2 mM NaN<sub>3</sub>, pH 6,2, glacé à 2400 rpm pendant 4 minutes. Chaque culot d'amibes est remis en suspension dans 1ml du tampon 17 mM Na, K-phosphate, pH 6,2. La radioactivité des échantillons est comptée par scintillation liquide et convertie en bactéries ingérées par amibe.

## **2.7 Sécrétion des enzymes lysosomales**

La sécrétion des enzymes lysosomales chez *Dictyostelium* est stimulée par des sucres non métabolisables (Crean et Rossomando, 1979). Ce processus est sélectif des enzymes du lysosome, sans lyse cellulaire et dépendant d'un apport d'énergie.

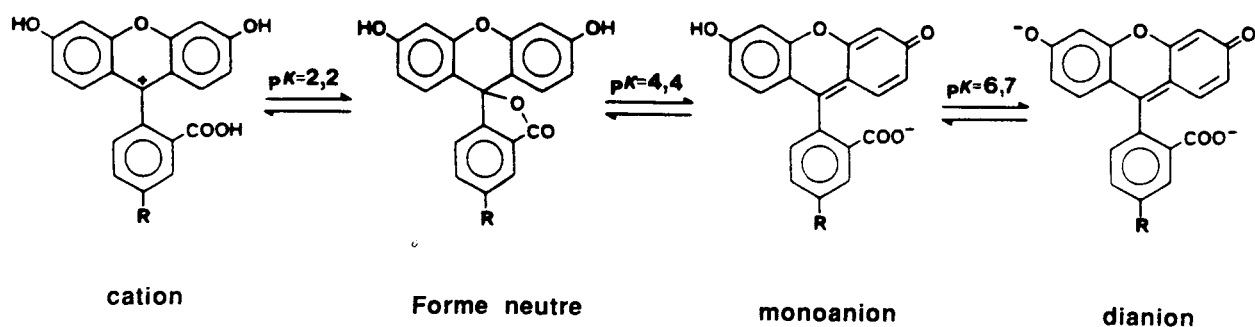
Les amibes ( $1 \times 10^7$  cellules/ml) sont mises en incubation dans du tampon 20 mM MES-Na, pH 6,5 contenant 0,1 M saccharose. La cinétique de sécrétion est suivie en faisant deux prélèvements de 1 ml à partir du milieu de sécrétion pour chaque condition expérimentale en fonction du temps. Dans le premier échantillon, l'activité enzymatique totale a été déterminée en ajoutant 20  $\mu$ l de 10 % (v/v) Triton X-100. Le second échantillon a été centrifugé 1 minute dans une centrifugeuse Eppendorf et l'activité enzymatique dans le surnageant a été mesurée après addition de 20  $\mu$ l de 10 % (v/v) Triton X-100. Les échantillons ont été gardés dans la glace avant de mesurer les activités enzymatiques de la phosphatase acide, de la N-acétylhexosaminidase et de l'  $\alpha$ -mannosidase.

## **2.8 Mesure du pH endosomal**

### **2.8 a Principe de la mesure du pH endosomal.**

La sonde utilisée pour mesurer le pH endosomal chez *Dictyostelium* est le FITC-dextran qui a servi aussi de marqueur de phase-fluide. La fluorescéine liée au dextran est une sonde convenable pour la mesure du pH dans les endosomes et en général à l'intérieur des compartiments acides, étant donné que son spectre d'absorption et d'excitation change entre pH 4 et 8.

La fluorescéine libre ou liée à des molécules comme l'albumine ou les dextrans existe en solution aqueuse sous six formes moléculaires dont l'équilibre dépend du pH de la solution. Chacune de ces formes a un spectre d'excitation et d'émission de fluorescence particulier. Aux pH physiologiques ( $\text{pH} \approx 7,0$ ), les formes prédominantes de la fluorescéine sont le monoanion ( $\text{FH}^-$ ) et le dianion ( $\text{F}^{2-}$ ) (figure 3).



**Fig. 3. Equilibres de protonation de la fluorescéine en solution aqueuse.** En solution aqueuse, la fluorescéine existe comme cation, sous une forme neutre, comme monoanion ou dianion selon le pH de la solution. Les valeurs de  $pK'_a$  2,2, 4,4, et 6,7 correspondent aux couples (cation/forme neutre), (forme neutre/moanoanion) et (monoanion/dianion), respectivement. R représente le groupe carbamyl.

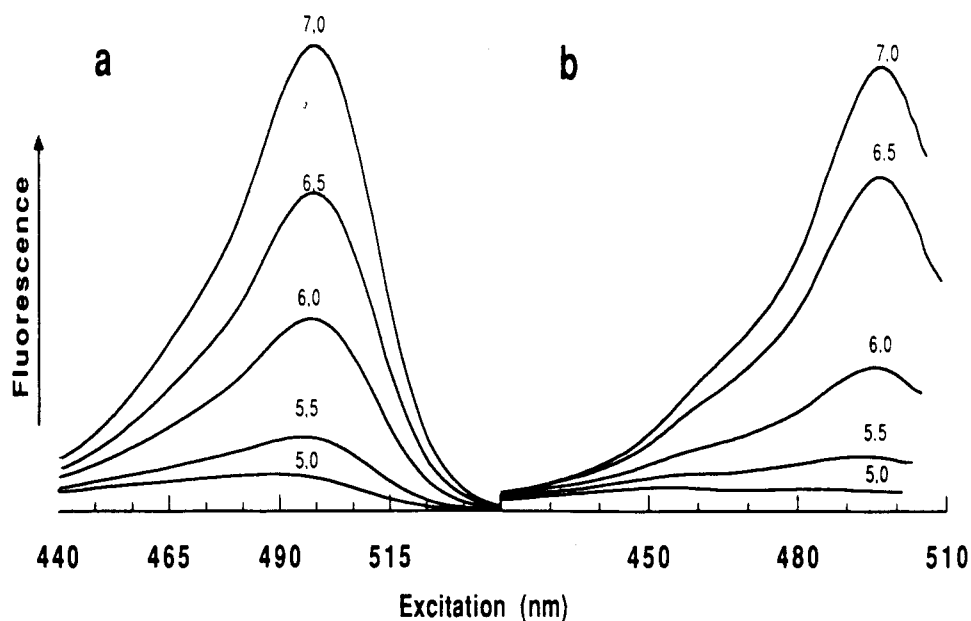
Les spectres d'excitation de fluorescence du FITC-dextran mesurés à une émission de 520 nm montrent un pic à 490 nm à pH alcalin et deux pics de plus faible intensité à 480 et 450 nm à pH acide (figure 4). Le rapport des intensités de fluorescence mesurées à 520 nm pour des excitations à 490 nm et 450 nm,  $R(490/450)$  est un indicateur de pH (Ohkuma & Poole, 1978 ; Geisow, 1984) indépendant du chemin optique et de la concentration en sonde.

L'équation qui exprime le rapport de fluorescence  $R(490/450)$  en fonction du pH est la suivante:

$$pH = pK'_a + \log \frac{(R-a)}{(b-R)}$$

Cette équation représente une courbe sigmoïde où R est le rapport de fluorescence,  $R(490/450)$ ; a et b sont des constantes qui dépendent des coefficients de fluorescence molaire des formes mono- et dianion à 490 nm et 450 nm respectivement.

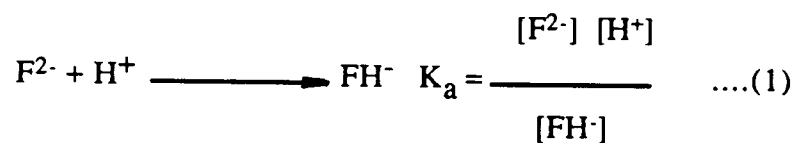
Expérimentalement, ces constantes représentent les asymptotes du rapport  $R(490/450)$  à pH acide et alcalin respectivement;  $pK'_a$  est la valeur apparente de  $pK_a$  du couple  $FH^-/F^{2-}$  de la fluorescéine. Le choix des longueurs d'onde utilisées pour calculer le rapport de fluorescence et déduire le pH est important étant donné que le  $pK'_a$  dépend du couple choisi.



**Fig. 4. Spectres de fluorescence du FITC-dextran.**a) Spectres *in vitro*. Les spectres d'excitation de fluorescence ont été déterminés avec 3 µg/ml de FITC-dextran dans des tampons NaPi à différents pH à une longueur d'onde d'émission de 520 nm. b) Spectres *in vivo*. Des amibes *Dictyostelium*,  $5 \times 10^6$  cellules/ml, sont chargées avec 2 mg/ml FITC-dextran, puis équilibrées à différents pH dans des tampons 100 mM acétate d'ammonium + 10 mM Tris pendant 45 minutes à 0-4 °C. La mesure de la fluorescence est faite à 22°C à une longueur d'onde d'émission de 520 nm.

### Equation de la variation du rapport de fluorescence avec le pH.

Considérons l'équilibre entre les formes monoanion,  $\text{FH}^-$  et dianion,  $\text{F}^{2-}$ , de la fluorescéine, prédominantes entre pH 4,0 et 8,0:



Puisque la fluorescence totale est égale à la somme des fluorescences des formes  $\text{FH}^-$  et  $\text{F}^{2-}$ :

$$E(490) = a_1[\text{FH}^-] + b_1[\text{F}^{2-}] \quad \text{.....(2)}$$

$$E(450) = a_2[\text{FH}^-] + b_2[\text{F}^{2-}] \quad \text{.....(3)}$$

avec

$E(490)$  = intensité de la fluorescence mesurée à 520 nm et excitée à 490 nm ( $\lambda_1$ ).

$E(450)$  = intensité de la fluorescence mesurée à 520 nm et excitée à 450 nm ( $\lambda_2$ ).

$a_1$  et  $a_2$  = Coefficients de fluorescence molaire de la forme acide à  $\lambda_1$  et  $\lambda_2$ .

$b_1$  et  $b_2$  = Coefficients de fluorescence molaire de la forme basique à  $\lambda_1$  et  $\lambda_2$ .

$[\text{FH}^-]$  et  $[\text{F}^{2-}]$  sont les concentrations des formes mono-anion et dianion correspondantes.

$$\text{On en tire : } \frac{E(490)}{E(450)} = \frac{a_1[\text{FH}^-] + b_1[\text{F}^{2-}]}{a_2[\text{FH}^-] + b_2[\text{F}^{2-}]} \quad \text{..... (4)}$$

En divisant par  $[\text{F}^{2-}]$ :

$$\frac{E(490)}{E(450)} = \frac{a_1([\text{FH}^-]/[\text{F}^{2-}]) + b_1}{a_2([\text{FH}^-]/[\text{F}^{2-}]) + b_2} \quad \text{..... (5)}$$

De la constante d'acidité du couple  $\text{FH}^-/\text{F}^{2-}$  (équation 1)  
on tire:

$$\frac{[\text{H}^+]}{K_a} = \frac{[\text{FH}^-]}{[\text{F}^{2-}]}$$

que l'on substitue dans l'expression du rapport  $R(490/450)$  (équation 5):

$$\frac{E(490)}{E(450)} = \frac{a_1([\text{H}^+]/K_a) + b_1}{a_2([\text{H}^+]/K_a) + b_2} \quad \dots\dots (6)$$

On obtient donc une relation pour le rapport de fluorescence qui est fonction des constantes et de la concentration en protons.

En exprimant l'équation (6) en fonction du pH et du  $\text{pK}_a$  on obtient:

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log(a_2/b_2) + \log \frac{[R - (a_1/a_2)]}{[(b_1/b_2) - R]} \quad \dots\dots (7)$$

Avec  $R = E(490)/E(450)$

Si on définit le  $\text{pK}'_a$  apparant comme:

$$\text{pK}'_a = \text{pK}_a + \log(a_2/b_2) \quad \dots\dots (8) \quad a = (a_1/a_2) \quad b = (b_1/b_2).$$

on tire l'équation:

$$\text{pH} = \text{pK}'_a + \log \frac{(R - a)}{(b - R)} \quad \dots\dots(9)$$



Cette équation exprime le rapport  $E(490)/E(450)$  en fonction du pH. Il n'est pas nécessaire de connaître les différents coefficients de fluorescence ou la constante d'équilibre pour utiliser le rapport  $R(490/450)$ , les pH étant déduits d'une courbe de calibration construite préalablement.

### **Courbe de calibration du FITC-dextran pour mesurer le pH endosomal.**

La détermination du pH endosomal se fait grâce à la courbe de titration du rapport de fluorescence  $R(490/450)$  du FITC-dextran en fonction du pH. Cette courbe peut être obtenue *in vitro* en mesurant la fluorescence du FITC-dextran en solution aqueuse à différents pH. Cependant, la fluorescence d'une sonde peut être affectée par des facteurs non déterminés, qui proviennent du milieu environnant à l'intérieur de la cellule. Pour tenir compte de l'influence du milieu environnant, il est convenable d'estimer le pH endosomal à l'aide d'une courbe d'étalonnage *in vivo*, où la fluorescence mesurée provient du FITC-dextran internalisé par des amibes, après avoir équilibré le pH intracellulaire avec le pH du milieu extérieur (Mc Neil et al., 1983; Pollard et al., 1979), et c'est la stratégie que j'ai choisie pour mesurer le pH endosomal chez l'amibe *Dictyostelium*.

La courbe de calibration *in vivo* est faite avec des amibes ayant pinocyté le FITC-dextran. Une suspension de  $5 \times 10^6$  amibes/ml est chargée avec 6 mg/ml de FITC-dextran pendant 3 heures en milieu axénique. Le FITC-dextran non internalisé est éliminé par deux lavages successifs par du tampon MES-BSA. Ensuite les pH des compartiments endosomaux des cellules sont équilibrés avec le pH du milieu extérieur par incubation dans un tampon 100 mM acétate d'ammonium-10 mM Tris, de pH 4,0 à 9,0 pendant 40 minutes à 4°C. Le rapport  $R(490/450)$  est exprimé en fonction du pH. Les données sont ajustées par une méthode des moindres carrés, non-linéaire, selon l'équation:  $pH = pK'_a + \log((R-a)/(b-R))$ . R représente le rapport de fluorescence  $R(490/450)$  à un pH donné; a et b sont des asymptotes du minimum et du maximum du rapport  $R(490/450)$  pour les valeurs la plus acide et la plus alcaline de pH respectivement ;  $pK'_a$  représente le  $pK_a$  apparent de dissociation de la fluorescéine. Une courbe représentative des calibrations *in vivo* est montrée dans la figure 5.

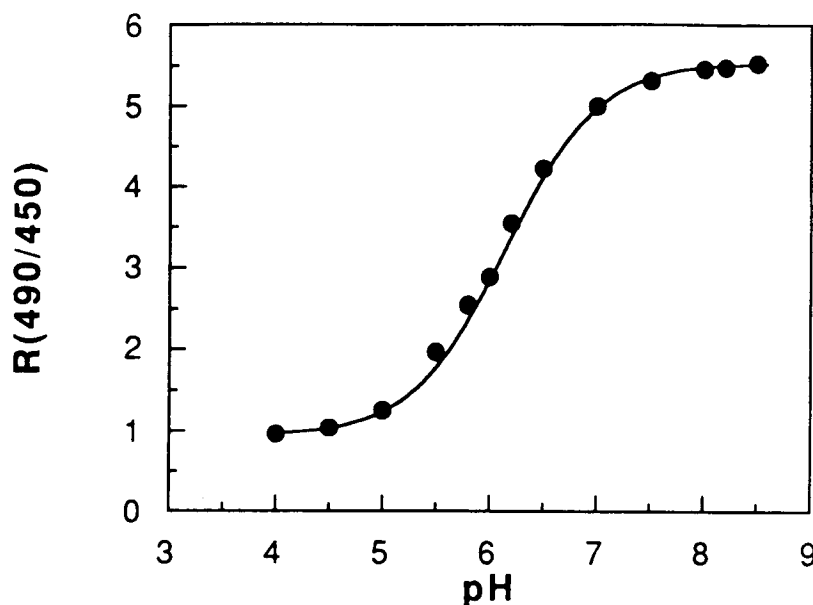


Fig. 5. Courbe de calibration *in vivo* de FITC-dextran pour mesurer le pH endosomal. Des amibes *Dictyostelium*,  $5 \times 10^6$  cellules/ml, ayant pinocyté le FITC-dextran sont équilibrées avec le pH extérieur comme décrit dans les méthodes. Le rapport de fluorescence R(490/450) est mesuré à 22°C. L'équation de corrélation de la courbe est  $\text{pH} = 6,15 + \log (R - 0,93)/(5,54 - R)$ .

Pour contrôler que le FITC-dextran conserve sa sensibilité en fonction du pH à l'intérieur des amibes, les spectres d'excitation de la fluorescence *in vivo* sont enregistrés avec des amibes ayant pinocyté le FITC-dextran, et dont le pH endosomal est équilibré avec le pH externe. Les spectres du FITC-dextran *in vivo* (figure 4b) à différents pH ne sont pas différents des spectres *in vitro* (figure 4a).

L'influence de la densité cellulaire et de la concentration de FITC-dextran sur les courbes d'étalonnage a été contrôlée et aucune différence significative sur les constantes de l'équation de titration n'est observée pour des densités cellulaires de  $2,5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$  et  $1 \times 10^7$  cellules/ml. Les moyennes ( $\pm$  déviation standard) de ces constantes sont les suivantes:  $\text{pK}'_a = 6,07 \pm 0,06$ ;  $a = 0,80 \pm 0,17$ ;  $b = 5,66 \pm 0,04$  ( $n = 3$ ). La concentration de FITC-dextran utilisée: 2, 5, 6 et 10 mg/ml, n'affecte pas non plus ces constantes:  $\text{pK}'_a = 6,11 \pm 0,08$ ;  $a = 0,97 \pm 0,18$ ;  $b = 5,59 \pm 0,08$  de façon significative.

### **2.8.b Mesure du pH endosomal lors des cinétiques de pinocytose et d'exocytose du FITC-dextran**

La détermination du pH endosomal lors des cinétiques de pinocytose est faite à 22°C, avec une suspension à  $5 \times 10^6$  cellules/ml contenant 6 mg/ml FITC-dextran, soit en milieu axénique ou en tampon 40 mM MES-Na, pH 6,5. La cinétique est démarrée par l'addition du FITC-dextran et son évolution est suivie par des prélèvements de 2 ml en fonction du temps.

Lors des cinétiques d'exocytose, la détermination du pH endosomal est réalisée avec des cellules ( $1 \times 10^7$  cellules/ml) ayant pinocyté le FITC-dextran à une concentration finale de 6 mg/ml pendant 2-3 h à 22°C. Après l'élimination du marqueur de phase-fluide extracellulaire, les cellules sont remises en suspension ( $1 \times 10^7$  cellules/ml) à 22°C en milieu axénique ou en tampon 40 mM MES-Na, pH 6,5 sans FITC-dextran. L'évolution de la cinétique est suivie par des prélèvements de 2 ml de la suspension cellulaire en fonction du temps. Pour la mesure du pH endosomal lors de la pinocytose et de l'exocytose, les échantillons prélevés en fonction du temps sont dilués et lavés deux fois à 4°C par du tampon MES-BSA. Les culots sont repris par 3 ml de tampon 40 mM MES-Na, pH 6,0 à 22°C.

Les mesures de fluorescence sont faites dans une cuve thermostatée à 22°C, en mesurant le rapport de fluorescence R(490/450) par la méthode décrite par Ohkuma & Poole (Ohkuma & Poole 1978 ; Geisow, 1984). Ces mesures sont faites à deux longueurs d'onde d'excitation, 490 et 450 nm, et une d'émission à 520 nm. Les mesures immédiates de fluorescence sont corrigées par soustraction du signal de fluorescence provenant d'échantillons de cellules mises en incubation sans FITC-dextran.

### **2.8.c Evolution du pH endosomal lors des étapes précoces de l'endocytose.**

Les mesures de pH sont faites avec des cellules ( $5 \times 10^6$  cellules/ml) dont les compartiments endosomaux sont préalablement chargés avec 2 mg/ml de FITC-dextran, à 22°C, pendant 3 heures en milieu axénique. Le marqueur résiduel extracellulaire est éliminé par lavage avec du tampon MES-BSA (0-4°C) comme dans la détermination du pH

endosomal lors des cinétiques de pinocytose.

Les amibes ( $5 \times 10^6$  cellules/ml) sont remises en suspension à 22°C en 40 mM MES-Na au pH voulu. L'évolution du rapport de fluorescence R(490/450) est suivie durant 15 minutes dans une cuve thermostatée à 22°C où les cellules sont maintenues en agitation. Les mesures de fluorescence sont corrigées par soustraction du signal de fluorescence provenant d'échantillons de cellules mises en incubation sans FITC-dextran.

## **2.9 Dosages enzymatiques**

Les activités enzymatiques de la p-nitrophényl phosphatase acide, de la N-acétylhexosaminidase et de l'  $\alpha$ -mannosidase ont été mesurées en utilisant des substrats qui libèrent par hydrolyse du p-nitrophénol. Celui-ci est mesuré colorimétriquement en milieu alcalin à 400 nm. Le coefficient d'extinction molaire du p-nitrophénol en solution alcaline à 400 nm est  $18,8 \times 10^6 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ .

Pour le dosage de la p-nitrophényl phosphatase acide les échantillons sont mis en incubation avec 6 mM p-nitrophénylphosphate dans du tampon 0,15 M glycine-HCl, pH 3,0, dans un volume final de 0,5 ml à 25°C durant 20 minutes ; pour la N-acétylhexosaminidase avec 10 mM de p-nitrophényl-N-acétylglucosamine, 20 minutes à 25°C dans du tampon 0,15 M glycine-HCl, pH 5,0 et pour l'  $\alpha$ -mannosidase avec 6,6 mM p-nitrophényl-D-mannopyranoside pendant 3 heures à 30°C dans du tampon 0,10 M Na-acétate, pH 5,0. Dans tous les cas, la réaction est stoppée par addition de 2 ml 0,1 M NaOH et la densité optique est lue immédiatement à 400 nm. La densité optique d'un blanc (milieu d'incubation sans échantillon) est retranchée de chaque valeur.

## **2.10 Détermination de l'ATP et de l'ADP par la méthode de la luciférine-luciférase**

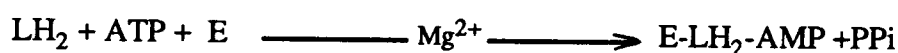
### **2.10.a Extraction des adénine-nucléotides.**

Les nucléotides sont extraits à partir d'une suspension de  $1 \times 10^7$  amibes/ml, en 40 mM MES-Na pH 6,5, par précipitation des protéines à 0°C en présence d'acide perchlorique à une concentration finale de 0,2 M. La suspension est homogénéisée à 4°C à l'aide d'un homogénéiseur de Potter et immédiatement centrifugée dans une centrifugeuse

Eppendorf pendant 10 minutes. Le surnageant qui est récupéré est neutralisé (entre pH 7,5 et 8,5) à l'aide de potasse concentrée. La suspension est gardée dans la glace pendant 30 minutes. Le perchlorate de potassium qui précipite est éliminé par centrifugation pendant 30 minutes à 38000 rpm (rotor Beckman R-40 ; ultracentrifugeuse Beckman L8-70). Le surnageant contenant les nucléotides est conservé à 4°C avant le dosage, ou il peut être stocké à -20°C.

## 2.10.b Dosage des nucléotides par la méthode du mélange luciférine-luciférase.

Principe du dosage. Les mécanismes et les cinétiques des réactions catalysées par la luciférase de luciole ont été décrits par De Luca et Mc Elroy (1974). Dans la première étape, la luciférine (LH<sub>2</sub>) et l'ATP réagissent pour former une luciféryl-adénylate (LH<sub>2</sub>-AMP) qui reste fortement liée au site catalytique de la luciférase.

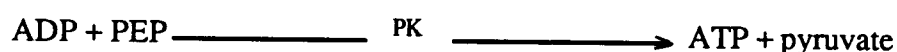


Quand cette forme de l'enzyme est exposée à l'oxygène moléculaire, la luciféryl-adénylate liée à l'enzyme est oxydée pour former une oxyluciférine (L), qui émet de la lumière en retournant à l'état fondamental.



Un photon est émis par chaque molécule de luciférine oxydée. Pour des concentrations en ATP faibles (< 10<sup>-6</sup> M) l'émission de lumière se maintient à un niveau constant pendant plusieurs minutes. En se plaçant dans des conditions appropriées de pH et de concentration en luciférine-luciférase, la quantité de lumière émise est proportionnelle à la quantité d'ATP présente dans le milieu.

L'ADP présent dans le milieu est dosé après sa transformation en ATP, en présence de phosphoénolpyruvate (PEP) et de pyruvate kinase (PK).



On introduit dans une cuve 0,6 ml d'une solution 0,5 mM PEP, 16 mM acétate de potassium, 0,1 M Tris-HCl, 0,05 mM EDTA, pH 7,7 et 0,15 ml de luciférine-luciférase (kit ATP-LKB). Après stabilisation de la ligne de base, on introduit l'échantillon contenant 7 à 40 pmol d'adénine-nucléotides totaux. Ensuite la quantité de lumière émise est mesurée. Elle est proportionnelle à l'ATP contenu dans l'échantillon. L'addition d'une quantité connue (7 pmol) d'une solution d'ATP sert à étalonner le dosage. Il est nécessaire de réaliser l'étalonnage en présence de l'échantillon afin qu'il soit mesuré dans les mêmes conditions, en particulier pour tenir compte de la diminution de la bioluminescence due à la présence de sels dans l'échantillon. L'addition de 5 µl de PK catalyse la transformation immédiate de l'ADP en ATP, et la quantité de lumière émise par l'ATP qui vient d'être formé est mesurée.

### **2.11 Mesure de la concentration intracellulaire de caféine**

Des amibes sont remises en suspension à  $1 \times 10^7$  cellules/ml à 22°C dans un tampon 40 mM MES-Na, pH 6,5 contenant 5, 7,5 ou 10 mM [7-méthyl- $^{14}\text{C}$ ]caféine (0,1 µCi/ml). Après une préincubation de 5 minutes, des échantillons de 1 ml sont prélevés et 5 µl de [ $^3\text{H}$ ]dextran sont ajoutés à ces échantillons afin de mesurer l'espace aqueux extracellulaire. Les échantillons sont centrifugés immédiatement pour éviter l'entrée du dextran par pinocytose, pendant 1 minute dans une centrifugeuse Eppendorf. Le surnageant est décanté et les parois des tubes sont essuyées avec du papier filtre. Le culot est remis en suspension dans 1 ml de tampon 40 mM MES-Na, contenant 0,25% (v/v) Triton X-100, pH 6,5 et la radioactivité est mesurée par scintillation liquide. La concentration intracellulaire de caféine a été déterminée par la quantité totale de [7-méthyl- $^{14}\text{C}$ ]caféine mesurée dans le culot cellulaire, corrigée par la quantité de [7-méthyl- $^{14}\text{C}$ ]caféine contenue dans l'espace extracellulaire. Cette mesure est faite avec le marqueur non-perméable [ $^3\text{H}$ ]dextran. Le volume cellulaire de l'amibe *Dictyostelium* utilisé pour la mesure de la concentration intracellulaire de caféine est de 0,520 pl (Klein & Satre, 1986). La pureté de la caféine a été déterminée par chromatographie sur couche mince sur des plaques de silica gel (60 F254, Merck) avec les solvants suivants: chloroforme/éthanol (50/10) et chloroforme/acétone/ammoniaque (50/50/1). Dans ces systèmes, les Rf pour la caféine sont respectivement 0,72 et 0,51.

# **LA PINOCYTOSE DE PHASE-FLUIDE**

### 3.1 Introduction.

La pinocytose de phase-fluide est effectuée par la plupart des cellules eucaryotes et son activité varie selon le type cellulaire. La pinocytose de phase-fluide est mesurée expérimentalement par la détermination de la quantité internalisée d'un marqueur présent dans le milieu extracellulaire qui ne pénètre pas à l'intérieur de la cellule ni par simple diffusion ni par un système de transport. Le FITC-dextran est un marqueur utilisé pour quantifier la pinocytose de phase-fluide dans différents types cellulaires, par exemple les cellules CHO (Ferris al., 1987), les macrophages (Berlin et Oliver, 1980), *Entamoebae histolytica*, (Aley et al., 1984), etc.

Chez *Dictyostelium*, Thilo et Vogel (1980) ont utilisé le FITC-dextran comme marqueur de phase-fluide, ensuite il est devenu un marqueur très utilisé pour mesurer la pinocytose de phase-fluide dans cet organisme (Maeda, 1983 ; Maeda et Kawamoto, 1986; Rossomando et al. 1981). Chez *Dictyostelium*, le FITC-dextran satisfait aux critères des marqueurs de phase-fluide (Thilo et Vogel, 1980; Maeda, 1983). Le FITC-dextran peut être détecté en faible quantité par la mesure de sa fluorescence. Des amibes incubées en présence de 10 mg/ml FITC-dextran poussent normalement et aucun effet toxique n'est évident. Klein et Satre (1986) ont montré par chromatographie d'exclusion de gel, que le FITC-dextran n'est pas dégradé par les amibes après des périodes d'incubation de 3 heures en milieu axénique et dans ces conditions, la fluorescéine reste associée au dextran. L'internalisation du FITC-dextran est directement proportionnelle à sa concentration dans le milieu d'incubation sans saturation jusqu'à 10 mg/ml.

Dans la mesure de la pinocytose de phase-fluide avec le FITC-dextran, certains facteurs sont sources potentielles d'erreur et provoquent éventuellement une surestimation du phénomène. Une adsorption du marqueur de phase-fluide peut avoir lieu sur des parties de la membrane plasmique. Les vésicules de pinocytose sont petites, en conséquence leur rapport de surface sur volume est donc très grand (chez *Dictyostelium* les vésicules d'endocytose ont une taille d'environ 0,3 - 0,4  $\mu\text{m}$ , Thilo, 1985). Une adsorption pendant la pinocytose conduirait à une surestimation de la quantité de fluide internalisé. Un autre problème est l'élimination du marqueur de phase-fluide extracellulaire avant de quantifier le marqueur interne, en tenant compte que le volume du compartiment endosomal est très faible par rapport au volume du milieu d'incubation. Chez *Dictyostelium*, ces sources d'erreur ont été minimisées dans les expériences de pinocytose de phase-fluide, par des lavages successifs avec un tampon contenant de l'albumine bovine lors de l'élimination du FITC-dextran non-internalisé.



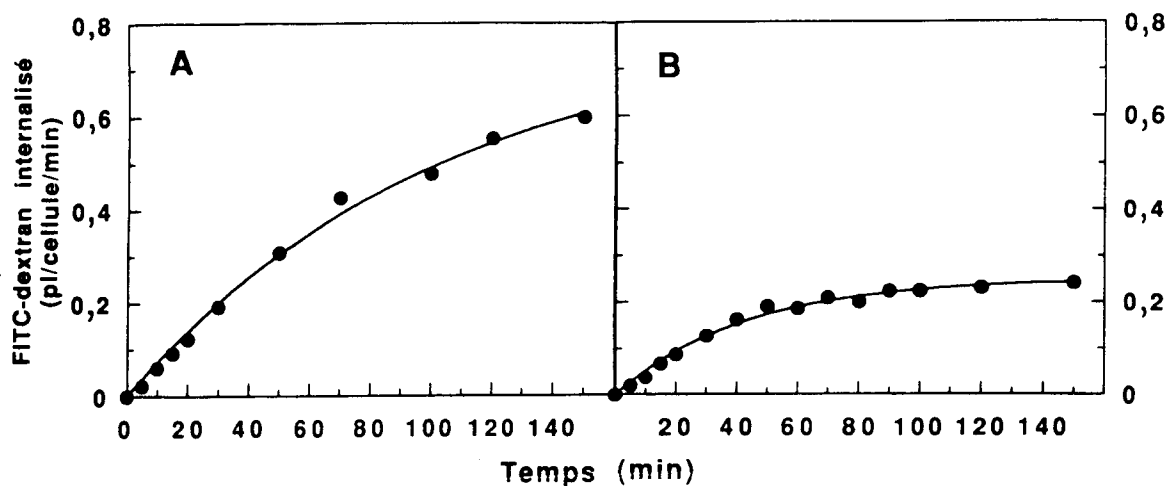
L'emploi du FITC-dextran selon le type cellulaire doit être aussi soumis à quelques précautions. Par exemple chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, l'endocytose est peu active (environ mille fois plus faible que chez *Dictyostelium*) et l'utilisation du FITC-dextran dans ce système, à des concentrations de l'ordre de 200 mg/ml a conduit à des conclusions fausses, imputables à la présence dans certains lots de FITC-dextran commerciaux (FD 70S, Sigma) d'une impureté de faible poids moléculaire, fluorescente et toxique pour les cellules (Makarow, 1985; Preston et al., 1987).

Dans ce chapitre, j'ai caractérisé les cinétiques de pinocytose de phase-fluide avec le FITC-dextran et un modèle cinétique a été proposé. L'effet de la température sur l'internalisation du marqueur de phase-fluide a été étudié. Enfin, l'exocytose du FITC-dextran a été étudiée à partir de cellules préalablement chargées avec ce marqueur de phase-fluide.

### **3.2 Cinétiques de pinocytose de phase-fluide**

Dans la littérature, il existe une diversité d'informations concernant les cinétiques d'internalisation des marqueurs de phase-fluide, généralement avec une première étape d'internalisation linéaire qui varie selon le type cellulaire. Chez le macrophage, Besterman et al. (1981) ont rapporté une cinétique d'internalisation du [ $^{14}\text{C}$ ] saccharose avec une phase linéaire rapide qui dure environ 10 minutes. Par contre, dans les cellules CHO, l'étape linéaire d'internalisation de HRP dure environ 60 minutes (Adams et al., 1982).

Les cinétiques de pinocytose de phase-fluide chez *Dictyostelium* ont été examinées en milieu axénique de croissance et en milieu non-nutritif (tampon 40 mM MES-Na, pH 6,5). Pour une expérience représentative faite dans les deux conditions (figure 6), le marqueur de phase-fluide est internalisé selon une cinétique biphasique, avec une première phase linéaire d'internalisation qui varie de 20 à 60 minutes selon le milieu d'incubation, suivie d'une phase de plateau où le volume de marqueur internalisé est d'environ 0,79 et 0,25 pl/cellule en milieu nutritif et non-nutritif respectivement. Le plateau de la pinocytose correspond à un équilibre dynamique entre l'entrée et la sortie du fluide (Klein et Satre, 1986) et se maintient constant pendant au moins 5 heures.

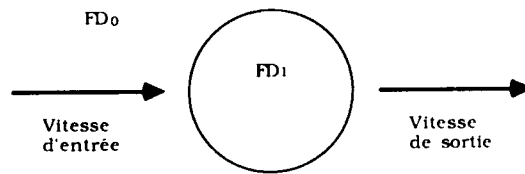


**Fig. 6. Cinétiques de pinocytose de phase-fluide ajustées avec un modèle à un compartiment endosomal.** Des amibes,  $1 \times 10^7$  cellules/ml, sont mises en pré-incubation en milieu axénique (A) ou en tampon MES-Na, pH 6,5 (B) à 22°C en agitation continue (170 rpm) pendant 15 minutes. La cinétique de pinocytose est démarrée par l'addition de FITC-dextran à une concentration finale de 2 mg/ml. L'internalisation du FITC-dextran est suivie en faisant des prélèvements de la suspension cellulaire en fonction du temps. Deux courbes représentatives des cinétiques de pinocytose sont ajustées selon l'équation  $V(t) = V_{\max} (1 - \exp^{-kt})$ . Les constantes cinétiques en milieu axénique sont 0,79 pl/cellule pour  $V_{\max}$  et  $7,72 \times 10^{-3}$  pl/cellule/min pour  $(k \times V_{\max})$ . Dans la cinétique en tampon MES-Na, les mêmes paramètres sont 0,25 pl/cellule et  $5,5 \times 10^{-3}$  pl/cellule/min respectivement.

Une cinétique biphasique d'internalisation analogue à celle de *Dictyostelium* est observée pour l'internalisation de FITC-dextran chez l'amibe *Entamoeba histolytica* où la pinocytose de phase fluide est aussi très active (Aley et al., 1984).

### 3.3 Modèle cinétique à un compartiment

La modélisation de courbes cinétiques de remplissage du compartiment endosomal chez *Dictyostelium* par un marqueur de phase-fluide a été entreprise. Un modèle à un compartiment endosomal unique a été considéré. A l'état stationnaire, la vitesse d'entrée du fluide extracellulaire à l'intérieur de l'endosome est égale à celle de sortie, donc le remplissage de l'endosome s'effectue selon le schéma suivant :



$FD_0$  et  $FD_1$  étant la concentration du marqueur de phase-fluide dans les compartiments extracellulaire et endosomal respectivement. La variation de la concentration du marqueur de phase-fluide à l'intérieur de l'endosome en fonction du temps de remplissage,  $d(FD_1)/dt$ , peut s'exprimer par l'équation

$$d(FD_1)/dt = (\text{vitesse d'entrée}) - (\text{vitesse de sortie}) \quad \dots\dots(1)$$

ou bien

$$d(FD_1)/dt = k (FD_0) - k (FD_1) \quad \dots\dots (2)$$

où  $k \text{ (min}^{-1}\text{)}$  est la constante cinétique des réactions.

En intégrant cette équation, on obtient :

$$(FD_1) = (FD_0) (1 - \exp^{-kt}) \quad \dots\dots (3)$$

On peut considérer que  $FD_0$  reste constante pendant tout le remplissage, car le volume extracellulaire est très supérieur au volume endosomal.

En considérant la relation

$$FD_1 = m(FD_1)/\text{vol}(FD_1) \quad \text{où} \dots\dots(4)$$

$m(FD_1)$  et  $\text{vol}(FD_1)$  sont la masse et le volume du marqueur à l'intérieur de l'endosome

et en remplaçant la relation (4) dans l'équation (3), on obtient

$$m(FD_1)/FD_0 = vol(FD_1) (1 - \exp^{-kt}) \quad \dots (5)$$

ou bien, la même équation en termes de volume internalisé en fonction du temps :

$$V(t) = V_{\max} (1 - \exp^{-kt}) \quad \dots (6)$$

Dans cette équation,  $V(t)$  est le volume de fluide internalisé au temps  $t$  ;  $V_{\max}$  est le volume de fluide internalisé au plateau de la pinocytose et  $k$  est une constante cinétique donnée en  $\text{temps}^{-1}$ . Le facteur  $k \times V_{\max}$  est constant et représente la vitesse initiale d'internalisation du marqueur de phase fluide. Les cinétiques de pinocytose de phase-fluide chez *Dictyostelium* s'expliquent par le modèle à un compartiment unique. Sur le plan cinétique, ce modèle considère un seul compartiment majeur, cependant, il n'est pas exclu que des compartiments d'un volume inférieur à celui sondé par le FITC-dextran soient présents sur la voie d'endocytose chez *Dictyostelium*.

L'application du modèle à un compartiment à une série d'expériences indépendantes ( $n=5$ ,  $\pm$  S.E.) permet le calcul de la moyenne de la vitesse initiale d'internalisation du FITC-dextran (index d'endocytose). En milieu axénique, cette vitesse est de  $(7,6 \pm 1,1) \times 10^{-3}$  pl/cellule/min et en tampon MES-Na de  $(4,6 \pm 1,0) \times 10^{-3}$  pl/cellule/min. Le volume moyen de fluide internalisé au plateau de la pinocytose en milieu nutritif est de  $0,76 \pm 0,14$  pl/cellule et de  $0,32 \pm 0,07$  pl/cellule en tampon MES-Na. L'activité pinocytaire plus intense en milieu nutritif peut s'interpréter selon l'hypothèse que dans ces conditions, un composant de l'endocytose à récepteurs intervient dans l'internalisation de fluide par la cellule (Rossomando, et al, 1981; Maeda, 1983; Maeda et Kawamoto, 1986).

Une comparaison des valeurs de fluide internalisé au plateau de la pinocytose de phase-fluide (0,76 et 0,32 pl/cellule en milieu nutritif et non-nutritif) et du volume aqueux cellulaire total (0,520 pl/cellule, Klein et Satre, 1986) laisse voir que le compartiment endocytaire occupe un volume au moins supérieur à 60 % du volume cellulaire. Une explication de ce phénomène est liée au fait que le volume du marqueur de phase-fluide internalisé est un volume apparent qui serait une conséquence de la concentration du marqueur à l'intérieur du compartiment endosomal. Cet effet de concentration pourrait avoir comme répercussion une augmentation de l'efficacité de la pinocytose de phase-fluide.

Dans d'autres cellules qui possèdent aussi une forte activité pinocytaire, l'endocytose est expliquée par des modèles cinétiques à plusieurs compartiments. Par exemple, dans la pinocytose et l'exocytose du [ $^{14}\text{C}$ ] saccharose chez le macrophage (Besterman et al., 1981), interviennent deux compartiments cinétiques connectés en série où le fluide internalisé passe du premier compartiment avec un  $t_{1/2}$  de 5 minutes vers un deuxième compartiment avec un  $t_{1/2}$  de 180 minutes. Un modèle qui prend en compte un endosome précoce, un compartiment de recyclage vers le milieu extracellulaire et un lysosome, a été proposé par Blomhoff et al., (1989) pour la pinocytose de phase-fluide du  $^{125}\text{I}$ -poly(vinyl-pyrrolidone) dans les cellules de parenchyme de foie.

### **3.4 Effet de la température sur la pinocytose de phase-fluide**

Une stratégie utilisable pour disséquer les étapes du trafic vésiculaire est la diminution de la température. Il est connu que l'activité endocytaire décroît avec une baisse de la température. Des températures égales ou inférieures à 20°C sont considérées comme "des températures critiques", utilisées pour inhiber de façon sélective la fusion entre les endosomes et les lysosomes. Ce critère a été utilisé à partir du travail de Dunn et al. (1980) qui ont montré que chez les hépatocytes, les asialoglycoprotéines internalisées à 17°C par l'endocytose à récepteurs, ne sont pas délivrées au lysosome, que leur dégradation est inhibée et que le ligand n'apparaît pas associé aux lysosomes.

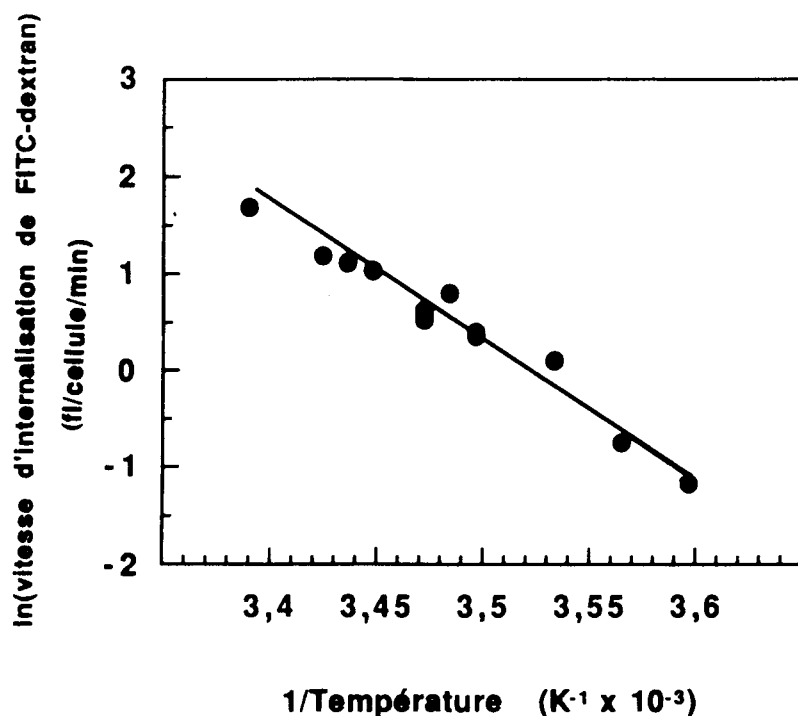
Afin d'identifier une éventuelle étape limitante du trafic vésiculaire dépendante de la température, j'ai examiné l'effet de la température sur la pinocytose de phase-fluide chez l'amibe *Dictyostelium*. Des cinétiques de pinocytose de phase-fluide avec le FITC-dextran sont effectuées sur des périodes de 3 heures, en tampon 40 mM MES-Na, pH 6,5, dans une gamme de températures entre 5 et 22°C. La vitesse d'internalisation du marqueur de phase-fluide décroît régulièrement lorsque la température diminue et aucune discontinuité dans cette diminution ne s'observe entre 22 et 5°C (tableau 2). L'internalisation du FITC-dextran est pratiquement abolie à 5°C. Le volume de fluide pinocyté au plateau de la pinocytose, calculé selon le modèle à un compartiment, ne varie pas de façon significative avec la température (tableau 2). Ces résultats excluent la possibilité d'une étape limitante chez *Dictyostelium* qui soit fonction de la température et appuient l'idée d'une voie endocytaire à un compartiment unique. En fait, des données récentes considèrent qu'une diminution de la température provoque simplement un ralentissement de la fusion entre les endosomes et les lysosomes (Haylett et Thilo, 1991).

**Tableau 2. Paramètres cinétiques de la pinocytose de phase-fluide chez l'amibe *Dictyostelium* en fonction de la température.**

température (°C)	Vmax	(k x Vmax) x 10 <sup>-3</sup>
5	0,18	0,31
10	0,20	1,11
13	0,27	1,48
15	0,25	1,76
18	0,28	3,04
22	0,25	5,32

Des cinétiques de pinocytose de phase-fluide avec le FITC-dextran sont réalisées en tampon 40 mM MES-Na, pH 6,5 dans une gamme de température entre 5 et 22°C. Les résultats sont ajustés selon l'équation  $V(t) = V_{\max}(1 - \exp^{-kt})$ . Vmax représente le volume de FITC-dextran internalisé au plateau de la pinocytose (pl/cellule) et (k x Vmax) la vitesse d'internalisation du marqueur de phase-fluide (pl/cellule/min). Dans tous les cas le coefficient de corrélation (r) est supérieur à 0,95.

L'énergie d'activation ( $E_a$ ) calculée selon l'équation d'Arrhenius pour la pinocytose de phase-fluide du FITC-dextran chez *Dictyostelium* est d'environ 27,0 kcal/mole (figure 7), valeur caractéristique d'un processus endocyttaire. Par exemple, chez les hépatocytes, l'énergie d'activation pour l'internalisation du Lucifer Yellow, un marqueur de phase-fluide, est 25,8 kcal/mol (Oka et al., 1989) et 26,5 kcal/mol pour l'endocytose de la <sup>125</sup>I-asialofétuine, internalisée par des récepteurs (Dunn et al., 1980). Les valeurs d' $E_a$  pour les deux types de processus sont tout à fait comparables, suggérant ainsi que la pinocytose de phase-fluide et l'endocytose à récepteurs sont thermodynamiquement équivalentes.

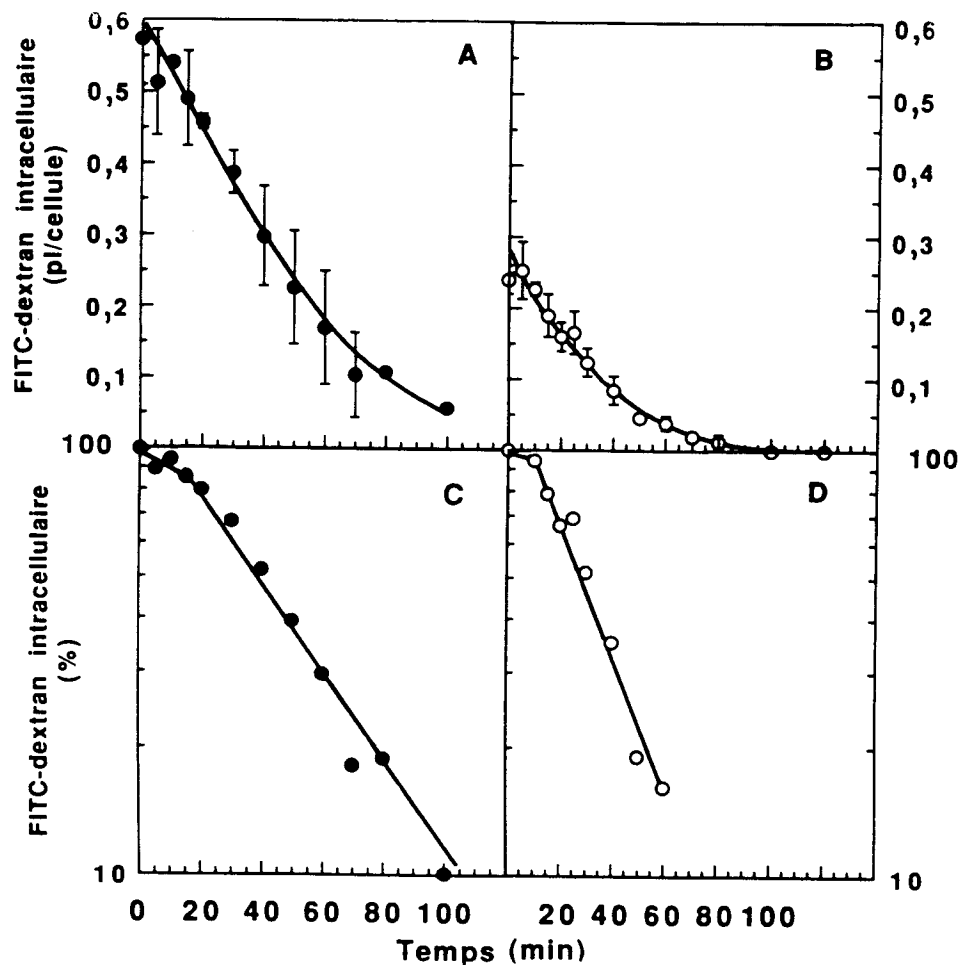


**Fig. 7** Graphique de l'équation d'Arrhenius pour la vitesse d'internalisation de FITC-dextran par l'amibe *Dictyostelium discoideum*. La vitesse d'internalisation de FITC-dextran est déterminée à différentes températures (5-22°C) comme indiqué dans le tableau 2. Le logarithme (ln) de la vitesse initiale est tracé en fonction de l'inverse de la température absolue. L'énergie d'activation calculée est de 27,0 kcal/mol.

### 3.5 Cinétiques d'exocytose du FITC-dextran

Le plateau de la pinocytose chez *Dictyostelium* se caractérise par un équilibre dynamique entre l'entrée et la sortie de fluide. Afin d'explorer la voie d'exocytose du marqueur de phase-fluide préalablement internalisé par les amibes, j'ai examiné les cinétiques d'exocytose de FITC-dextran. Ces expériences sont effectuées avec des amibes ayant pinocyté le FITC-dextran pendant 3 heures dans une première phase, puis remises en suspension dans un milieu en absence de marqueur de phase-fluide. Dans ces conditions, le FITC-dextran est exocyté pratiquement en totalité dans le milieu extracellulaire avec une cinétique de pseudo-premier ordre, précédée d'une courte phase de latence. Dans la représentation semi-logarithmique de l'exocytose en milieu axénique, la phase de latence est d'environ 10 minutes suivie d'une phase linéaire avec un  $t_{1/2}$  de 40 minutes et

une constante de pseudo-premier ordre de  $0,02 \text{ minutes}^{-1}$  (figure 8). Pour l'exocytose en tampon 40 mM MES-Na (pH 6,5), dans la même représentation, le temps de latence est d'environ 5 minutes, avec un  $t_{1/2}$  de 30 minutes et une constante de  $0,03 \text{ minutes}^{-1}$ . Le profil cinétique de l'exocytose de FITC-dextran n'est pas modifié par le temps de charge avec le marqueur de phase-fluide. Les résultats de ces expériences indiquent que le FITC-dextran atteint un compartiment endocyttaire cinétique unique.



**Fig. 8 Cinétique d'exocytose de FITC-dextran chez les amibes *Dictyostelium*.** Des amibes, ( $1 \times 10^7$  cellules/ml), ayant pinocyté le FITC-dextran à une concentration finale de 2 mg/ml pendant 180 minutes, sont remises en suspension à 22°C en milieu axénique (courbes A et C) ou en tampon 40 mM MES-Na, pH 6,5 (courbes B et D). L'exocytose du marqueur de phase-fluide est mesurée en fonction du temps. Les courbes C et D sont les représentations semi-logarithmiques de l'exocytose de FITC-dextran en milieu axénique et tampon MES-Na respectivement. Ces courbes sont normalisées à 100 %.



Ces expériences mettent en évidence la différence existant avec l'exocytose des marqueurs de phase-fluide dans d'autres cellules, par exemple lors de l'exocytose de peroxidase de raifort dans les cellules CHO (Adams et al., 1982) et du [ $^{14}\text{C}$ ] saccharose chez le macrophage (Besterman et al., 1981) où deux compartiments endocytaires interviennent, dont un d'eux s'échange très lentement avec l'extérieur.

### 3.6 Discussion.

Le FITC-dextran est internalisé par les amibes *Dictyostelium* selon une cinétique biphasique avec une phase initiale linéaire qui varie de 20 à 60 minutes, où le marqueur de phase-fluide est internalisé avec une vitesse d'environ  $7,6 \times 10^{-3}$  et  $4,6 \times 10^{-3}$  pl/cellule/min, en milieu nutritif et non-nutritif, respectivement. Cette phase est suivie d'un plateau où le volume de FITC-dextran internalisé est 0,76 et 0,32 pl/cellule en milieu nutritif et non-nutritif respectivement. L'activité endocyttaire plus élevée dans un milieu nutritif est expliquée selon l'idée que dans ces conditions participe un composant de l'endocytose à récepteurs (Rossomando et al., 1981 ; Maeda, 1983 ; Maeda et Kawamoto, 1986). Le fait que le volume internalisé soit supérieur au volume cellulaire (0,520 pl/cellule, Klein et Satre, 1986) est probablement dû à un effet de concentration du marqueur de phase-fluide dans le compartiment endosomal, ce qui pourrait augmenter l'efficacité de la pinocytose de phase-fluide.

La pinocytose de phase-fluide du FITC-dextran est expliquée selon un modèle à un seul compartiment, qui n'exclut pas pourtant l'existence d'autres compartiments plus petits ou l'existence d'étapes cinétiques plus rapides. Un modèle d'internalisation de fluide à deux compartiments en parallèle a été testé, néanmoins une meilleure corrélation est obtenue avec le modèle à un compartiment.

L'activité endocyttaire décroît avec une baisse de la température. Dans une gamme de température entre 22 et 5°C on n'observe aucune discontinuité dans la diminution de l'activité endocyttaire, fait qui est en accord avec l'existence d'un seul compartiment. A 5°C, la vitesse d'internalisation de FITC-dextran est d'environ 5% par rapport à la vitesse mesurée à 22°C. L'énergie d'activation pour la pinocytose de phase-fluide chez *Dictyostelium* est de 27 kcal/mol, une valeur caractéristique d'un processus endocyttaire (Weigel et Oka, 1981 ; Oka et Weigel, 1989).

L'exocytose du FITC-dextran s'effectue avec une cinétique caractérisée par une étape initiale de latence qui dure quelques minutes, suivie d'une étape où l'exocytose est de pseudo-premier ordre. Une explication pour le temps de latence est de considérer ce temps comme le temps mis par les cellules pour récupérer leur exocytose après des lavages au froid.

# **LA CAFEINE**

## **4.1 Introduction**

Divers résultats de la littérature suggèrent que la concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  influence le trafic membranaire et l'endocytose chez *Dictyostelium* (De Chastellier et Rytter, 1982) et dans d'autres systèmes (Beckers et Balch, 1989). En particulier, Miyata et al. (1989) ont montré chez *Dictyostelium* qu'une augmentation de la concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  inhibe la pinocytose de phase-fluide induite par des facteurs de croissance (EGF). Maeda et Kawamoto (1986) ont montré que la pinocytose de FITC-dextran chez *Dictyostelium* diminue avec des concentrations croissantes de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire, effet probablement lié à une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire.

Dans le muscle squelettique et d'autres types cellulaires, la caféine est un agent pharmacologique dont un des effets est de perturber l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$ . Palade et al. (1987) ont montré que la caféine augmente la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire par un relâchement du  $\text{Ca}^{2+}$  à partir du réticulum sarcoplasmique. Chez *Physarum polycephalum*, la caféine provoque aussi la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  à partir de vésicules intracellulaires (Matthews, 1977). Chez *Dictyostelium*, Brenner et Thoms (1984) ont suggéré que la caféine entraîne une perturbation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. Plus récemment, Abe et al. (1989) ont démontré par l'utilisation de sondes fluorescentes sensibles au  $\text{Ca}^{2+}$ , que la caféine entraîne une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire chez *Dictyostelium*.

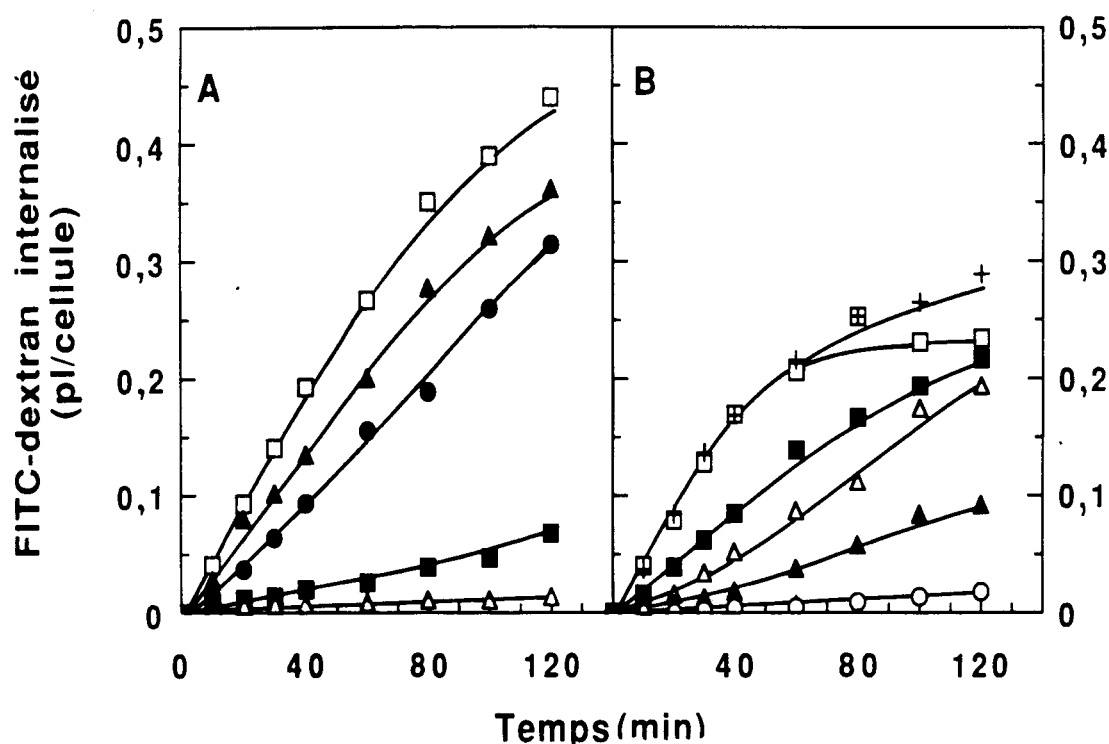
En tenant compte de l'ensemble de ces résultats, j'ai donc examiné directement l'action de la caféine sur la pinocytose de phase-fluide, la phagocytose, la sécrétion des enzymes lysosomales et la croissance axénique chez l'amibe *Dictyostelium*. Les résultats obtenus sont exposés dans ce chapitre.

## **4.2 Effets de la caféine sur l'endocytose chez *Dictyostelium***

### **4.2.a Inhibition de la pinocytose de phase-fluide**

La caféine inhibe la pinocytose de phase-fluide d'une façon qui dépend de la concentration. Les cinétiques de pinocytose de phase-fluide en présence de concentrations croissantes de caféine sont montrées dans la figure 9. En milieu axénique ou en milieu non-nutritif, la vitesse d'internalisation du marqueur de phase-fluide et le plateau de la

pinocytose sont diminués pour des concentrations de caféine entre 1 et 10 mM.



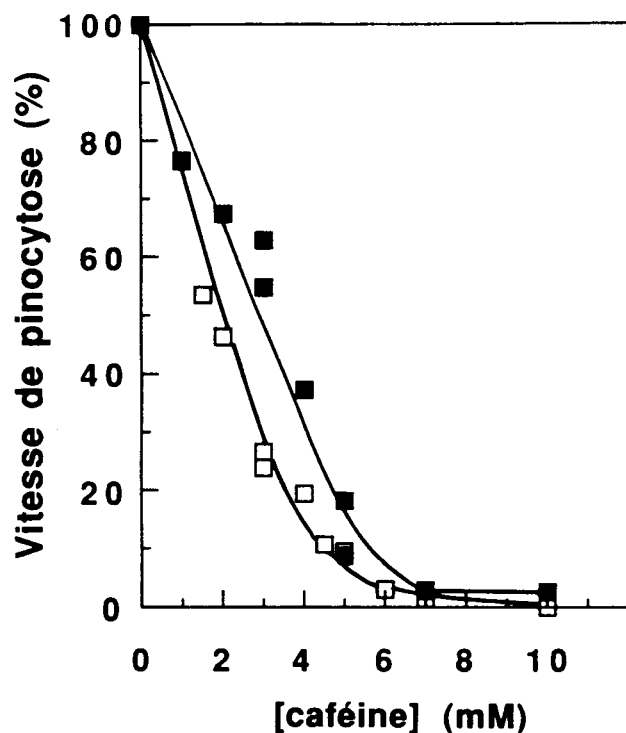
**Fig. 9. Inhibition de la pinocytose de phase-fluide par la caféine.**

A) Des amibes *Dictyostelium* ( $1 \times 10^7$  cellules/ml) sont mises en incubation en milieu axénique contenant 2 mg/ml FITC-dextran et différentes concentrations de caféine. La quantité de FITC-dextran internalisé est déterminée comme décrit dans le chapitre de matériel et méthodes. (□) Expérience contrôle sans caféine; (▲) 1 mM; (●) 3 mM; (■) 5 mM et (△) 10 mM caféine. B) Une expérience équivalente est réalisée avec des amibes mises en incubation en tampon 40 mM MES-Na, pH 6,5. (□) contrôle sans caféine; (■) 1,5 mM; (▲) 4,5 mM; (○) 6 mM caféine; (△) 4,5 mM caféine plus 10 mM adénosine et (+) 10 mM adénosine.

Une analyse quantitative du processus d'inhibition indique que l'entrée du FITC-dextran est inhibée à 50 % pour des concentrations d'environ 1,5 mM caféine dans un tampon 40 mM MES-Na, pH 6,5 et 3 mM, en milieu nutritif (figure 10).

L'inhibition de la pinocytose de phase-fluide par la caféine s'établit très rapidement après addition de l'inhibiteur à la suspension d'amibes. Aucune période de préincubation avec la caféine n'est nécessaire. *Dictyostelium* est un organisme particulièrement

impermeable vis-à-vis de plusieurs composés et l'entrée de la caféine à l'intérieur de la cellule a été contrôlée. Les niveaux intracellulaires de caféine ont été déterminés après une incubation des cellules avec la [7-méthyl- $^{14}\text{C}$ ]caféine.



**Fig. 10. Titration de l'inhibition de la pinocytose de phase-fluide par la caféine.** Les vitesses initiales d'internalisation de FITC-dextran sont déterminées en milieu axénique (■) ou en tampon 40 mM MES-Na, pH 6,5 (□), à partir des cinétiques de pinocytose (fig. 9) et tracées en fonction de la concentration de caféine. Les valeurs maximales de pinocytose en l'absence de caféine utilisées pour la normalisation des courbes sont 0,48 pl/cellule/min en milieu axénique et 0,42 pl/cellule/min en tampon MES-Na

Comme indiqué dans le tableau 3, après 5 minutes d'incubation en présence de caféine, la concentration intracellulaire de caféine est en équilibre avec la concentration du milieu extracellulaire. Les amibes sont donc perméables à la caféine. L'équilibre de concentration se maintient au cours du temps, au moins pendant 2 heures, durée de la plupart des expériences d'endocytose.

L'inhibition de la pinocytose par la caféine est réversible. Si des amibes traitées avec 7,5 mM caféine en milieu axénique pendant 2 heures sont lavées et remises en suspension dans du milieu axénique frais sans caféine, leur activité de pinocytose est récupérée et l'internalisation du FITC-dextran est équivalente à celle mesurée avec des cellules qui n'ont pas été en contact avec l'inhibiteur.

**Tableau 3. Pénétration de la caféine chez l'amibe *Dictyostelium*.**

Concentration de caféine (mM)			
extracellulaire	intracellulaire*		
5,0	5,5	±	0,4
7,5	8,6	±	0,7
10,0	10,2	±	0,4

\*Moyenne ± S.E. (n = 3).

Des suspensions à  $1 \times 10^7$  cellules/ml sont mises en incubation à 22°C dans un tampon 40 mM MES-Na, pH 6,5 contenant 5, 7,5 ou 10 mM [7-méthyl- $^{14}\text{C}$ ]caféine (0,1  $\mu\text{Ci/ml}$ ) pendant 5 minutes. Des échantillons de 1 ml de chaque suspension sont prélevés et centrifugés pendant 1 minute dans une centrifugeuse Eppendorf. La concentration intracellulaire de caféine est déterminée par la quantité totale de [7-méthyl- $^{14}\text{C}$ ]caféine dans le culot d'amibes mesurée par scintillation liquide comme indiqué dans le chapitre matériel et méthodes.

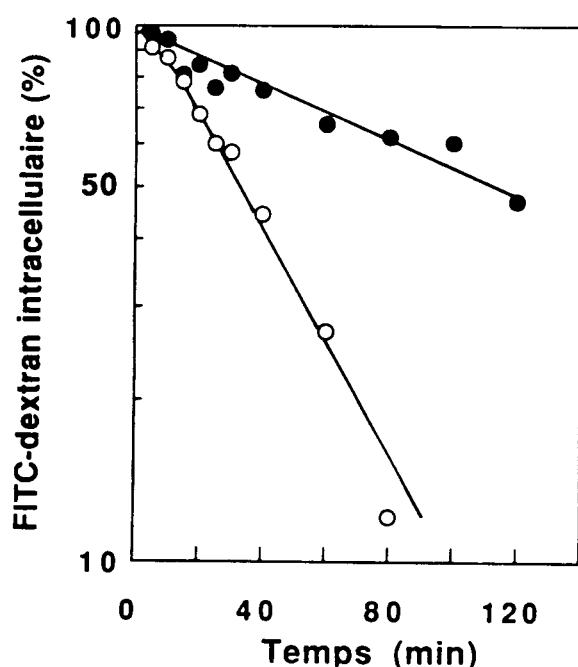
Pour contrôler l'éventuel effet de la caféine sur le métabolisme énergétique de *Dictyostelium* pendant des temps plus prolongés que ceux testés par Brenner et Thoms (1984), le niveau d'ATP a été mesuré par la méthode de la luciférine-luciférase dans des cellules qui sont traitées avec cet inhibiteur. Une suspension d'amibes ( $1 \times 10^7$  cellules/ml) est mise en incubation en tampon 40 mM MES-Na, pH 6,5, avec 7,5 mM caféine pendant 150 minutes à 22°C. A la fin de l'incubation, le niveau d'ATP est déterminé dans un extrait de nucléotides obtenu par précipitation des protéines en présence d'acide perchlorique, comme indiqué dans le chapitre matériel et méthodes. Dans les cellules qui ont été mises en incubation en absence de caféine, le niveau d'ATP mesuré sur trois expériences indépendantes est  $1,26 \pm 0,15$  mM ATP ( $\pm$  S.E.) et dans les cellules traitées avec la caféine, il est  $1,12 \pm 0,1$  mM ATP. Le niveau d'ATP chez *Dictyostelium* n'est donc pas modifié par la caféine. Ces résultats sont en accord avec des expériences de résonance magnétique nucléaire (RMN) du  $^{31}\text{P}$  effectuées au laboratoire par Jean Martin, qui montrent que la caféine dans les concentrations et temps d'incubation utilisés dans ce travail ne modifie pas le niveau des nucléosides triphosphates ou l'inositol hexaphosphate. Le pH cytosolique chez *Dictyostelium*, mesuré par la même technique (pH 7,3), n'est pas non plus modifié par la caféine.

L'adénosine à une concentration 10 mM protège, de façon partielle, de l'effet inhibiteur induit par la caféine. L'adénosine par elle même ne modifie pas la pinocytose de phase-fluide chez *Dictyostelium* (figure 9B).

Afin d'examiner si l'effet inhibiteur de la caféine sur la pinocytose est exclusif à ce composé, d'autres méthylxantines ont été testées sur la pinocytose. La théophylline (10 mM), la théobromine (2 mM), la paraxanthine (5 mM), la 8-chlorothéophylline (2 mM) ou la 7( $\beta$ -hydroxyéthyl)théophylline (10 mM), n'ont pas d'effet sur la pinocytose de phase-fluide chez *Dictyostelium*.

#### 4.2.b Inhibition de l'exocytose du marqueur de phase fluide FITC-dextran.

L'exocytose du marqueur FITC-dextran est inhibée par la caféine. Des amibes qui ont été préalablement chargées avec du FITC-dextran sont remises en suspension dans un milieu sans marqueur de phase-fluide. La cinétique d'exocytose est déterminée par des prélèvements de la suspension en fonction du temps. L'exocytose du FITC-dextran obéit à une cinétique du pseudo-premier ordre (figure 11) avec un  $t_{1/2}$  de 25 minutes. En présence de 7,5 mM caféine, l'exocytose du marqueur est fortement inhibée et le  $t_{1/2}$  est de 130 minutes, valeur qui indique que l'exocytose en présence de caféine est ralentie environ cinq fois.

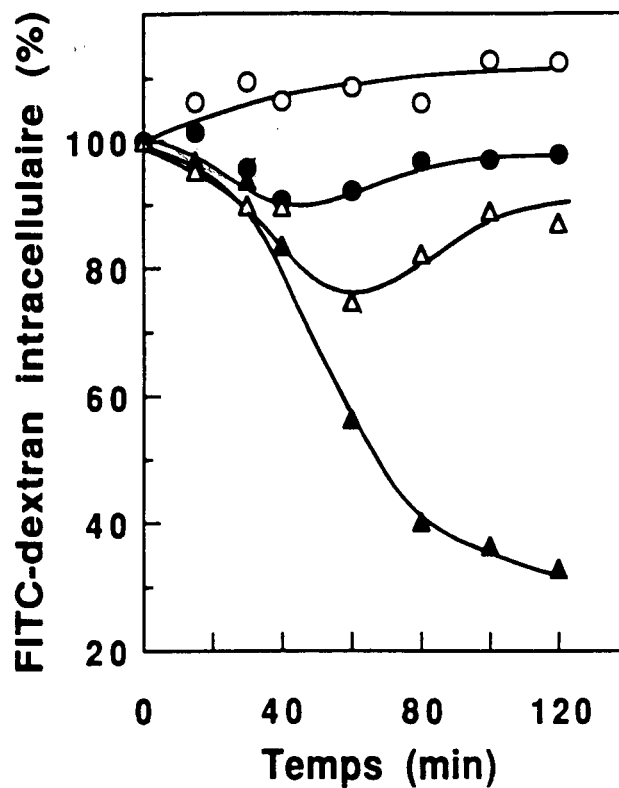


**Fig. 11. Cinétique d'exocytose de FITC-dextran en présence de caféine.** L'exocytose est examinée sur des cellules ayant préalablement internalisé le marqueur de phase-fluide en tampon 40 mM MES-Na, pH 6,5; après une incubation de 120 minutes, l'internalisation de FITC-dextran est de 0,24 pl/cellule. Les cellules sont remises en suspension à 22°C dans un tampon 40 mM MES-Na, pH 6,5 (○) et dans le même tampon contenant 7,5 mM caféine (●). L'exocytose du FITC-dextran est mesurée en fonction du temps. La quantité de FITC-dextran est mesurée comme indiqué dans le chapitre de matériel et méthodes.



#### 4.2.c Effet sur le plateau de la pinocytose.

L'effet de la caféine a été analysé sur le plateau de la pinocytose. A ce stade, la caféine est ajoutée à une suspension d'amibes, toujours en présence de FITC-dextran extracellulaire. Dans ces conditions, le marqueur de phase-fluide reste piégé à l'intérieur des cellules sans être exocyté de façon sensible. Dans les mêmes conditions, le vanadate, un inhibiteur des voies d'endocytose chez l'amibe *Dictyostelium* (Klein et al., 1989), induit l'exocytose du FITC-dextran. Quand le vanadate et la caféine sont ajoutés en même temps, le flux de FITC-dextran induit par le vanadate est aboli (figure 12).



**Fig. 12. Effet de la caféine et du vanadate sur le plateau de pinocytose.** Une suspension d'amibes *Dictyostelium* est mise en incubation avec 2 mg/ml FITC-dextran en milieu axénique à 22°C. Après 150 minutes d'internalisation, le volume de marqueur internalisé est de 0,7 pl/cellule (valeur prise comme 100%). A ce stade, la caféine ou le vanadate ou les deux sont ajoutés à des parties aliquotes de la suspension d'amibes et la quantité de FITC-dextran est mesurée en fonction du temps. Les symboles représentent: (○) partie aliquote sans inhibiteur utilisée comme contrôle; (●) 7,5 mM caféine; (▲) 2 mM vanadate; (△) 7,5 mM caféine plus 2 mM vanadate

#### 4.2.d Inhibition de la phagocytose de *E. coli*.

La phagocytose de bactéries est le mécanisme naturel de nutrition chez *Dictyostelium*. Des bactéries comme *E.coli* sont phagocytées par les amibes après reconnaissance par des récepteurs de surface. (Loomis, 1975; Vogel et al., 1980; Raper, 1984).

La phagocytose est examinée avec des amibes récoltées à partir du milieu axénique de croissance, et mises en incubation avec des bactéries qui ont été marquées biosynthétiquement au  $^{14}\text{C}$  avec un mélange d'acides aminés comme indiqué dans le chapitre "Matériel et Méthodes". La cinétique de phagocytose de *E. coli* B/r par *Dictyostelium* est montrée dans la figure 13. Les amibes phagocytent avec une vitesse initiale de 1,1 bactérie/min. Au bout de 90 minutes le niveau de phagocytose atteint un plateau d'environ 60 bactéries/amibe, en accord avec des travaux précédents effectués par Glynn (1981). En présence de caféine, la phagocytose est inhibée ( $\text{IC}_{50}$  de 7.5 mM).

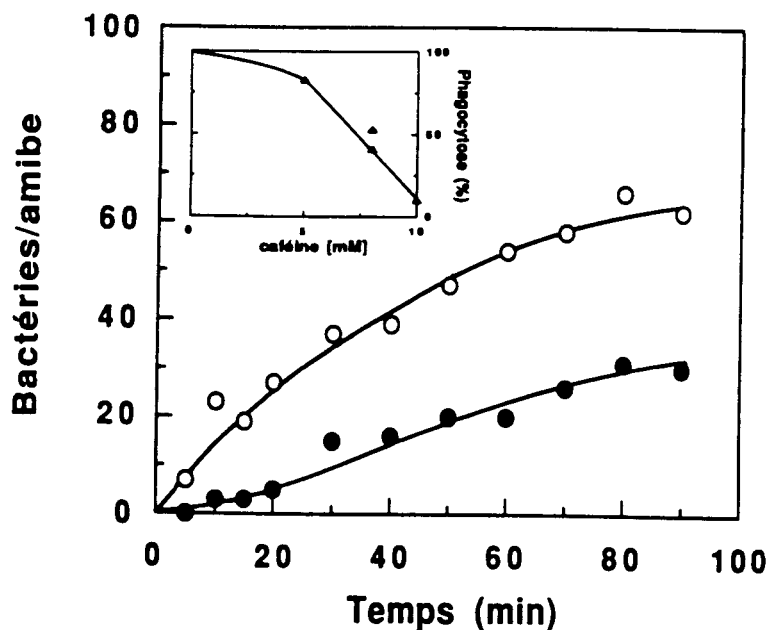


Fig. 13. Effet de la caféine sur la phagocytose des bactéries chez *Dictyostelium*. Des amibes *Dictyostelium* sont mises en incubation dans un tampon Na-phosphate à 22°C, avec des bactéries *E. coli*, souche B/r, radioactives (voir chapitre matériel et méthodes). L'internalisation des bactéries est mesurée en fonction du temps, dans une expérience sans caféine (○) et en présence de 7,5 mM caféine (●). La courbe en insert représente la vitesse initiale de phagocytose des bactéries en fonction de la concentration de caféine. La valeur de la vitesse initiale en absence d'inhibiteur, normalisée à 100 %, est de 1,1 bactérie phagocytée/amibe/min.

#### 4.2.e Inhibition de la sécrétion des enzymes lysosomales.

La sécrétion des enzymes lysosomales chez *Dictyostelium* est stimulée par des sucres non métabolisables (Crean et Rossomando, 1979). Ce processus est sélectif des enzymes du lysosome, sans lyse cellulaire et dépendant d'un apport d'énergie. La cinétique de sécrétion de la phosphatase acide par *Dictyostelium* en présence de 0,1 M saccharose est montrée dans la figure 14.

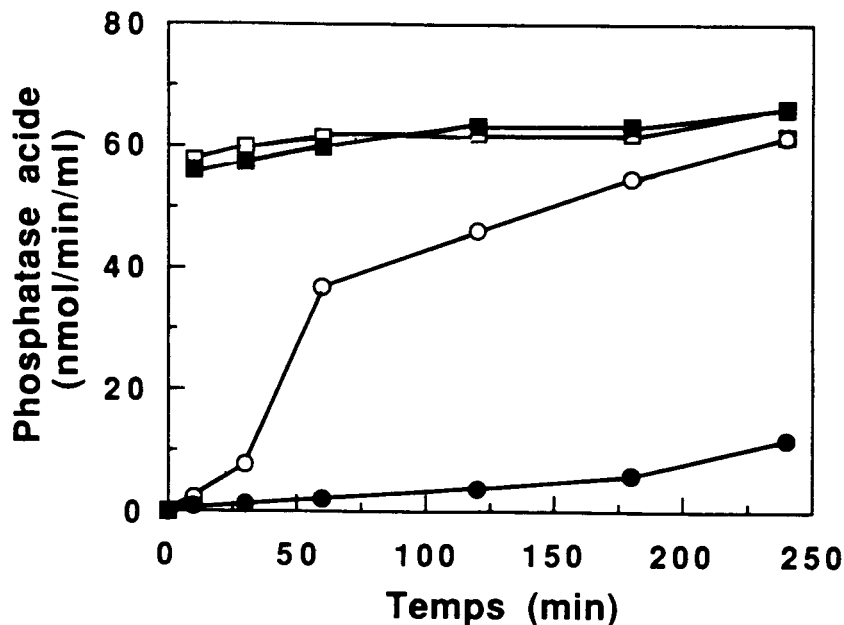


Fig. 14. Inhibition de la sécrétion de la phosphatase acide par la caféine. Des amibes *Dictyostelium* sont mises en suspension ( $1 \times 10^7$  cellules/ml) à 22°C dans un tampon 20 mM MES-Na, pH 6,5, contenant 0,1 M de saccharose. L'activité enzymatique est déterminée en fonction du temps, dans le milieu extracellulaire (○, ●) et dans la fraction totale (□, ■) des échantillons prélevés. Les symboles ouverts correspondent à l'expérience contrôle sans caféine, et les symboles fermés à l'expérience avec 5 mM caféine.

La première étape de la sécrétion est une étape lente où environ 10 % de l'activité totale sont libérés dans le milieu extracellulaire après 30 minutes d'incubation. Dans la phase suivante, la vitesse de sécrétion augmente sensiblement et plus de 80% de l'activité enzymatique totale sont libérés dans le milieu extracellulaire après 4 heures d'incubation. La sécrétion de phosphatase acide est inhibée si le milieu contient de la caféine. En présence de 5 mM caféine, la cinétique de sécrétion est linéaire en fonction du temps et 16% seulement de l'activité enzymatique se retrouvent dans le milieu extracellulaire après 4 heures d'incubation.

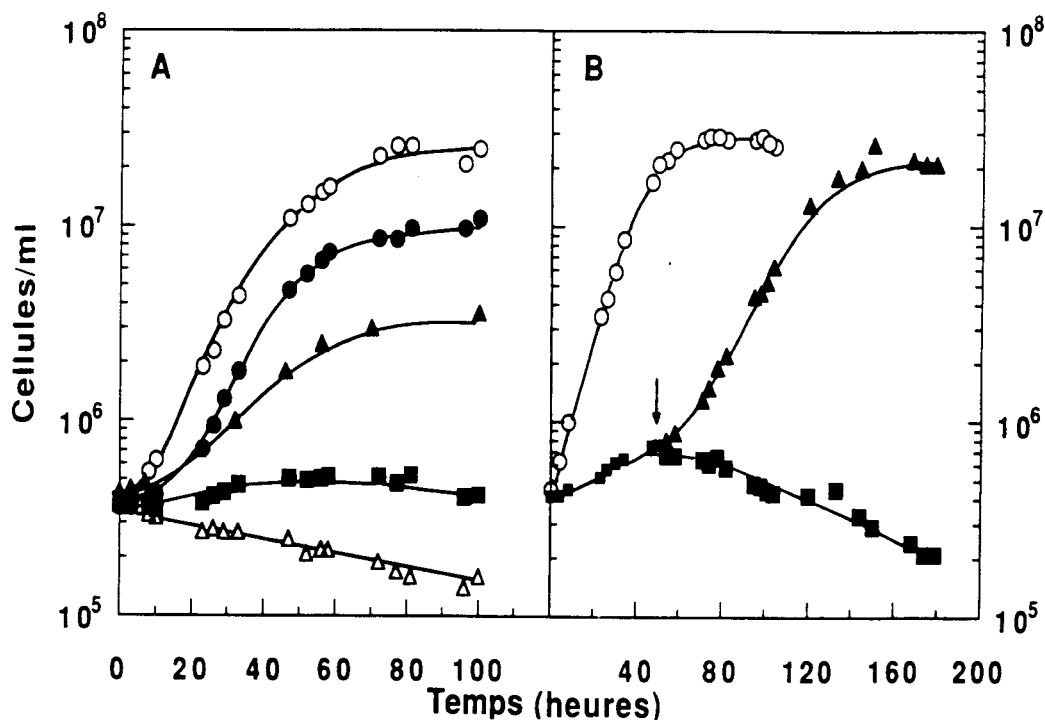
### **4.3 Inhibition de la croissance axénique.**

L'effet de la caféine sur la croissance axénique de *Dictyostelium* n'avait pas été présenté dans la littérature. La croissance axénique de *Dictyostelium* a été mesurée en présence de concentrations croissantes de caféine (0-10 mM) comme cela est montré dans la figure 15 A. Dans l'expérience contrôle, les amibes croissent avec un temps de doublement de  $8,4 \pm 0,9$  heures et la densité cellulaire au plateau atteint  $(2,6 \pm 0,2) \times 10^7$  cellules/ml (moyenne  $\pm$  S.E., n=5). Ces valeurs sont en accord avec celles qui ont été rapportées par Watts et Ashworth (1970) et Loomis (1975).

La caféine à une concentration 2,5 mM provoque une légère inhibition de la croissance. Pendant les premières 10 heures on observe une phase de latence après laquelle les cellules reprennent une vitesse de croissance comparable à celle du contrôle et atteignent une densité cellulaire au plateau de  $1 \times 10^7$  cellules/ml. Avec 5 mM de caféine, l'inhibition de la croissance est totale. Une forte concentration de caféine (10 mM) cause la lyse progressive des cellules avec un  $t_{1/2}$  d'environ 70 heures.

La viabilité des amibes après un contact avec la caféine a été déterminée. La viabilité cellulaire est déterminée par clonage sur milieu gélosé en présence de *Klebsiella aerogenes* comme source de nutriments (voir chapitre de Matériel et Méthodes). La viabilité des amibes qui ont été en contact avec 5 mM caféine pendant 16 heures reste très élevée (supérieure à 90%), mais baisse à 59 % et 23 % après des périodes d'incubation de 24 et 48 heures respectivement.

L'effet inhibiteur de la caféine sur la croissance est réversible (figure 15 B). Cette réversibilité est démontrée par des expériences où les cellules sont mises en incubation en milieu axénique contenant 5 mM de caféine pendant 48 heures, puis récoltées et lavées pour éliminer la caféine présente dans le milieu extracellulaire. Les cellules sont ensuite remises en suspension en milieu axénique sans caféine. Après une phase de latence d'environ 15 heures, les cellules reprennent leur capacité de croissance. Cette latence est en accord avec le fait qu'après le traitement avec la caféine, 23 % des cellules sont viables. Après la phase de latence, la vitesse de croissance et la densité cellulaire au plateau sont comparables à celles de l'expérience contrôle sans caféine.



**Fig. 15. Croissance des amibes *Dictyostelium discoideum* en présence de caféine.** A) Des amibes sont mises en suspension en milieu axénique contenant différentes concentrations de caféine: (○) contrôle sans caféine; (●) 2,5 mM; (■) 5 mM; (△) 10 mM caféine; (▲) 5 mM caféine plus 10 mM adénosine. B) Après 48 heures d'incubation avec (■) 5 mM caféine, la caféine est éliminée du milieu de culture par lavage (indiqué par la flèche) et les amibes sont remises en suspension en milieu axénique sans caféine (▲). Expérience contrôle sans caféine (○).

De nombreuses cellules sont capables de métaboliser la caféine (pour revue Arnaud, 1987). Afin de savoir si la caféine est métabolisée par les amibes *Dictyostelium*, une suspension de  $2 \times 10^7$  amibes/ml est mise en incubation à 22°C en présence de 5 mM [7-méthyl- $^{14}\text{C}$ ]caféine pendant 6 heures. La caféine et ses éventuels métabolites dans les compartiments intra- et extracellulaires sont analysés par chromatographie sur couche mince comme décrit dans le chapitre de matériel et méthodes. Après la période d'incubation avec la caféine, plus de 95 % de la radioactivité migre comme une tache unique qui correspond à la caféine. Aucun métabolite plus polaire que la caféine n'est détectable.

De manière analogue aux expériences de pinocytose, l'adénosine, à une concentration de 10 mM, entraîne un effet protecteur sur la croissance et empêche de façon partielle l'inhibition induite par 5 mM de caféine. Dans une expérience en présence d'adénosine (10 mM) seule, le temps de doublement et la densité cellulaire au plateau sont identiques à ceux mesurés en absence d'adénosine. Ces résultats excluent la possibilité que l'adénosine serve de source de nutriments pour la croissance de *Dictyostelium*.

#### 4.4 Effet sur la différenciation cellulaire.

Le programme de différenciation cellulaire est induit par un jeûne (Loomis, 1975; Bonner, 1987; Raper, 1984; Gerish, 1987; Sussman, 1987). Récemment, il a été montré que la caféine n'affectait pas les étapes précoces de la différenciation mais augmentait cependant la taille des territoires d'agrégation (Siegert et Weijer, 1989).

J'ai réalisé des expériences pour étudier l'effet de la caféine sur le cycle morphogénétique complet. En présence de différentes concentrations de caféine (tableau 4), la formation de fructifications s'effectue en environ 24 heures, comme dans une expérience en absence de caféine, mais le nombre de fructifications est augmentée et leur taille moyenne (nombre de cellules/fructification) est diminuée en présence de caféine.

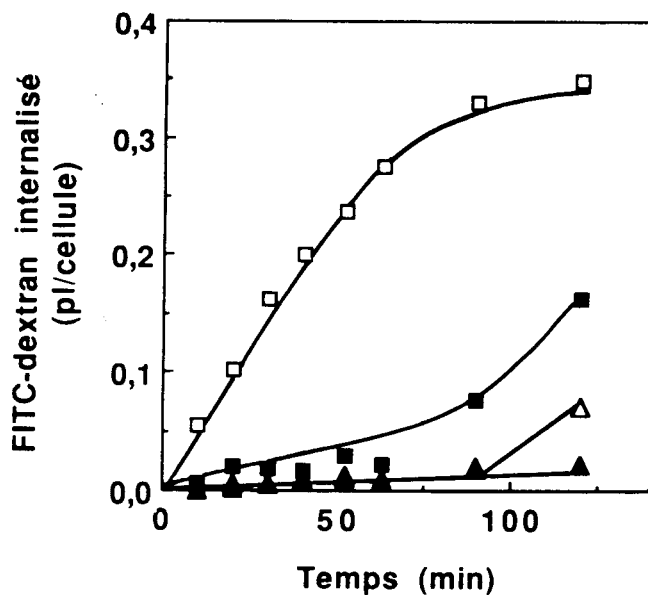
**Tableau 4. Effet de la caféine sur la différenciation cellulaire chez *Dictyostelium*.**

Caféine (mM)	nombre de fructifications/cm <sup>2</sup>
0	367 ± 38
2,5	429 ± 27
5,0	922 ± 85

Des amibes ( $2,5 \times 10^7$  cellules) sont mises à jeûner sur des filtres Millipore HABP de 25 mm de diamètre comme décrit par Sussman (1987). Après 36 heures à 23 °C, les filtres ont été photographiés et le nombre de fructifications déterminé. Les valeurs indiquées dans le tableau sont la moyenne ± la déviation standard de quatre expériences indépendantes.

### Effet du $\text{LaCl}_3$ sur la pinocytose de phase-fluide.

En tenant compte des travaux de la littérature qui montrent une corrélation entre le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et l'endocytose ainsi que l'induction d'une augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire par la caféine, on postule l'hypothèse que la caféine inhibe la pinocytose chez *Dictyostelium* par une augmentation de la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique. Pour vérifier cette hypothèse, d'autres agents qui modifient la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire ont été testés. Un ionophore à  $\text{Ca}^{2+}$  : A23187, ne peut pas être utilisé dans nos expériences car il provoque chez *Dictyostelium* une diminution du niveau d'ATP intracellulaire (Brenner et Thoms, 1984) indispensable pour l'endocytose. Une alternative pour étudier les altérations du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire est l'emploi du cation trivalent  $\text{La}^{3+}$ . L'effet du  $\text{La}^{3+}$  a été bien caractérisé chez *Dictyostelium* (Europe-Finner et Newell, 1985; Böhme et al., 1987; Lydan et O'Day, 1988); ce cation inhibe le transport du  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau de la membrane plasmique. Des expériences de pinocytose de phase-fluide montrent que le  $\text{LaCl}_3$  occasionne une forte inhibition de la pinocytose de phase-fluide dans l'intervalle de concentrations entre 10 et 100  $\mu\text{M}$  (figure 16). A faible dose de  $\text{LaCl}_3$  (10  $\mu\text{M}$ ), les amibes échappent à l'inhibition après une heure d'incubation.



**Fig. 16. Inhibition de la pinocytose de phase-fluide par le  $\text{LaCl}_3$ .** Les amibes *Dictyostelium* ( $1 \times 10^7$  cellules/ml) sont mises en incubation à 22°C en tampon 40 mM MES-Na, pH 6,5 contenant 2 mg/ml FITC-dextran, en présence de différentes concentrations de  $\text{LaCl}_3$ : (□) expérience contrôle sans inhibiteur; (■) 10  $\mu\text{M}$ , (△) 50  $\mu\text{M}$ , (▲) 100  $\mu\text{M}$   $\text{LaCl}_3$ .

#### 4.6 Discussion

La caféine agit comme un inhibiteur très efficace de l'endocytose chez *Dictyostelium*; elle agit à des doses employées couramment dans cet organisme (1-10 mM) pour explorer divers mécanismes cellulaires (Brenner et Thoms, 1984; Hagmann, 1986; Abe et al., 1988; Siegert et Weijer, 1989).

La caféine inhibe la pinocytose de phase-fluide ainsi que l'exocytose du marqueur de phase-fluide FITC-dextran ( $IC_{50} = 1,5$  à  $3$  mM). La phagocytose de *E. coli* est inhibée avec des concentrations plus élevées ( $IC_{50} = 7,5$  mM) que pour l'inhibition de la pinocytose de phase-fluide. La sécrétion d'une enzyme lysosomale, la phosphatase acide, est également inhibée par la caféine. Cette inhibition est probablement une conséquence directe de l'inhibition de la pinocytose de phase-fluide, étant donné que la sécrétion de phosphatase acide est induite par le saccharose, et que celui-ci est internalisé par pinocytose de phase-fluide.

La croissance axénique est inhibée par la caféine en parallèle avec le blocage de la pinocytose de phase-fluide. L'inhibition de l'endocytose par la caféine est immédiate, fait qui est probablement le résultat de la pénétration rapide de la caféine à l'intérieur des cellules ainsi que son équilibre avec la concentration extracellulaire. Ces résultats sont en accord avec la pénétration rapide de la caféine dans d'autres systèmes biologiques (pour revue Arnaud, 1987).

L'effet inhibiteur de la caféine sur l'endocytose est spécifique de cette méthylxantine. D'autres méthylxanthines comme la théophylline, la paraxanthine ou la théobromine n'ont aucun effet sur la pinocytose de phase-fluide. Une explication possible de cet effet différentiel est une perméabilité membranaire différente vis à vis des méthylxanthines (pour revue, Endo, 1985) ou bien des cibles différentes.

Sur le plan de la différenciation cellulaire, *Dictyostelium* est capable de compléter son cycle de différenciation en présence de caféine. Ce résultat suggère que le mécanisme de différenciation n'est pas sensible à la caféine ou bien que lors de la différenciation, l'entrée de la caféine est réduite. Sur les amibes, la caféine induit un état de pseudo-jeûne provoqué par l'abolition de la pinocytose de phase-fluide. Il est possible que la caféine induise des réponses cellulaires qui ne sont normalement déclanchées que lors des états de jeûne (Mann et al., 1988).



Divers mécanismes cellulaires ont été rapportés sensibles à la caféine chez l'amibe sociale *Dictyostelium discoideum*. Un autre système sensible à la caféine chez *Dictyostelium* et bien caractérisé est le système de l'adénylate cyclase (pour revue voir Janssens et Van Haastert, 1987). L'action de la caféine est dépendante des conditions expérimentales. D'une part, quand *Dictyostelium* est soumis à des conditions de jeûne, la caféine empêche la stimulation de l'activité adénylate cyclase par l'AMPc et la libération conséquente de l'AMPc (Brenner et Thoms, 1984). La caféine agit dans ce cas comme inhibiteur classique du système de relâchement d'AMPc chez *Dictyostelium* pendant le programme de différenciation cellulaire (Wang et al., 1986; Devreotes et al., 1987; Mann et Firtel, 1987; Drumond et Chisholm, 1988; Klein et al., 1988 b). D'autre part, quand les amibes sont dans un milieu nutritif, la caféine a d'autres effets, comme l'expression, par exemple, de l'adénylate cyclase (Hagmann, 1986, 1988).

La caféine agit traditionnellement sur la phosphodiesterase, cependant un effet de la caféine à ce niveau est exclu chez *Dictyostelium*, car Chang (1986) a montré que cette enzyme est insensible à cette drogue.

En ce qui concerne la cible moléculaire de la caféine responsable de l'inhibition de l'endocytose, l'hypothèse qui semble la plus probable pour expliquer l'effet de cette drogue est de considérer l'inhibition de l'endocytose reliée à une perturbation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. La régulation du niveau de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique est un élément fondamental pour le maintien des fonctions cellulaires et très probablement pour l'endocytose. Ainsi le fonctionnement d'une cellule en repos exige que la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  libre cytosolique soit maintenue à un niveau très bas. Chez *Dictyostelium*, la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique est d'environ 50 nM (Abe et al., 1988) une valeur qui est très inférieure à celle du milieu environnant. Chez *Dictyostelium*, la régulation de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire dans la cellule en repos pourrait s'effectuer comme dans les cellules non-excitables, par exemple les cellules HL-60 ou les neutrophiles (Krause, K-H. et al., 1989). Dans ces cellules, les réservoirs intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$  et la membrane plasmique sont deux structures qui jouent un rôle clé dans la régulation du cation divalent. La faible concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire est maintenue par une  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase qui pompe l'ion divalent à l'intérieur des réservoirs intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$ , soit à l'intérieur du réticulum sarcoplasmique, soit à l'intérieur des réservoirs spécialisés pour stocker le  $\text{Ca}^{2+}$ , appelés calciosomes (Volpe et al., 1988).

Une  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de la membrane plasmique semble être la responsable du pompage de  $\text{Ca}^{2+}$  vers l'extérieur de la cellule. Chez *Dictyostelium*, Böhme et al. (1987) ont mis en évidence une  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de haute affinité, sensible au  $\text{La}^{3+}$ , à la surface de la membrane plasmique, responsable du pompage de  $\text{Ca}^{2+}$  vers l'extérieur de la cellule.

Wessling-Resnick et Braell (1990) ont démontré dans un système acellulaire que la fusion de vésicules d'endocytose des cellules K562 (lignée cellulaire humaine) et des cellules CHO est inhibée à des concentrations micromolaires de  $\text{Ca}^{2+}$ . Ce résultat suggère que des concentrations élevées de  $\text{Ca}^{2+}$  empêchent les processus de fusion vésiculaire lors de l'endocytose. Par ailleurs, l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire est impliquée dans la régulation de plusieurs processus biologiques (Berridge, 1988), par exemple dans les processus de polymérisation d'actine et modifie de cette façon le mouvement cellulaire (Europe-Finner et Newell, 1986 ; McRobbie et Newell, 1984 ; Liu et Newell, 1988).

L'hypothèse d'une inhibition de l'endocytose dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire est appuyée par l'inhibition de la pinocytose de phase-fluide par le cation  $\text{La}^{3+}$ . Les ions  $\text{La}^{3+}$  inhibent la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de la surface de la membrane plasmique chez *Dictyostelium* (Böhme et al., 1987). L'inhibition de cette enzyme entraîne une inhibition du pompage de  $\text{Ca}^{2+}$  vers l'extérieur de la cellule provoquant une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire de façon analogue à la caféine.

Un autre mode d'action de la caféine est la diminution du seuil de déclenchement du processus de relargage de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire ; celui-ci dépend de l'augmentation même de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire induite par le calcium même ( $\text{Ca}^{2+}$  induit- $\text{Ca}^{2+}$  release) comme dans les cellules musculaires. L'augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique aurait comme conséquence la décharge des réservoirs intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$  (Europe-Finner et Newell, 1986; Palade et al., 1987; Abe et al., 1988; Berridge et Galione, 1988). De ce fait, l'augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  par la caféine pourrait s'expliquer par une décharge des réservoirs intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$ .

L'adénosine, qui s'oppose d'une manière partielle aux effets inhibiteurs de la caféine, pénètre rapidement chez l'amibe *Dictyostelium* (Khachatrian et al., 1987). Un effet antagoniste de la caféine sur les récepteurs de l'adénosine signalé chez des cellules eucaryotes (Arnaud, 1987), semble peu probable chez *Dictyostelium* (Newell, 1982), si

on tient compte des concentrations millimolaires de caféine nécessaires pour inhiber l'endocytose. L'effet de l'adénosine chez *Dictyostelium* pourrait être similaire à celui qui se présente dans le muscle. Dans le réticulum sarcoplasmique, il a été démontré que l'adénosine est un faible agoniste du transport de  $\text{Ca}^{2+}$  ; en fibres intactes, elle inhibe le relâchement de  $\text{Ca}^{2+}$  par déplacement de l'ATP endogène de son site d'action (Endo, 1985). Néanmoins, il semble que la corrélation entre les effets de la caféine et ceux de l'adénosine soit complexe. La cible de la caféine et la séquence d'événements qui sont déclenchés par cette drogue restent à déterminer.

**LA  
CYCLOHEXIMIDE**

## 5.1 Introduction.

L'effet des inhibiteurs de la synthèse de protéines sur les voies d'endocytose est un sujet de controverse. D'une part, des effets inhibiteurs ont été rapportés dans plusieurs types cellulaires: la cycloheximide et d'autres inhibiteurs de la synthèse de protéines inhibent l'endocytose chez le macrophage, le monocyte, *Amoeba proteus* et *Tetrahymena pyriformis* (Antoni et al., 1986; Banno et al., 1987; Cohn, 1966; Johansson et Josefsson, 1984; Schuit, 1979; Seglen, 1983); chez l'amibe *Dictyostelium*, l'internalisation de l'acide  $\epsilon$ -aminocaproïque, qui semble s'effectuer par pinocytose de phase fluide, est inhibée par la cycloheximide (North et Williams, 1978). Des analogues des acides aminés qui perturbent la synthèse protéique inhibent aussi la pinocytose de phase-fluide chez le macrophage (Cohn, 1966) et chez *Dictyostelium* (Rossomando et al., 1981; Kinsella et al., 1986). D'autre part, il existe des travaux qui indiquent que l'endocytose à récepteurs est insensible à l'inhibition de la synthèse protéique dans des systèmes cellulaires comme le carcinome du sein, des cellules B, 3T3 ou des cellules Vero (Aboud-Pirak et al., 1988; Kakiuchi et al., 1990; Knutson et al., 1985; Machy et al., 1990). Ces résultats pourraient susciter l'hypothèse que l'endocytose à récepteurs est insensible à l'inhibition de la synthèse de protéines, en opposition à l'endocytose non-spécifique; pourtant, il a été rapporté récemment que dans les cellules 3T3, la pinocytose de phase-fluide est insensible à l'action de la cycloheximide (DeCourcy et Storrie, 1991). Egalement, la cycloheximide n'a pas d'effet inhibiteur sur la sécrétion des enzymes lysosomales chez le macrophage (Jessup et al., 1983) ou sur l'internalisation et l'hydrolyse de la cathepsine B dans l'endosome précoce des cellules 3T3 (Bowser et Murphy, 1990).

L'ensemble des résultats suggère la possibilité de l'existence de différentes voies d'endocytose dans les différents types cellulaires, qui sont soit sensibles soit insensibles à l'inhibition de la synthèse de protéines.

Cette controverse m'a incité à aborder dans ce chapitre l'analyse de l'action de plusieurs inhibiteurs de la synthèse protéique sur l'endocytose chez l'amibe *Dictyostelium discoideum* : la pinocytose de phase fluide, la phagocytose et la sécrétion des enzymes du lysosome. L'effet de la cycloheximide a été analysé plus en détail. La souche mutante X6 de *Dictyostelium*, résistante à la cycloheximide a été employée comme contrôle dans toutes ces expériences.

## 5.2 La cycloheximide et ses effets sur l'endocytose chez *Dictyostelium*.

### 5.2.a Inhibition de la pinocytose de phase-fluide.

L'effet de la cycloheximide a été examiné avec des amibes *Dictyostelium*, de la souche AX2. Les cellules sont mises en préincubation dans du milieu axénique pendant 30 minutes à 22°C avec des concentrations différentes de cycloheximide (de 0,05 à 2 mM). Les cinétiques de pinocytose sont démarrées par l'addition du marqueur de phase fluide, FITC-dextran. Des courbes représentatives de ces expériences sont montrées dans la figure 17.

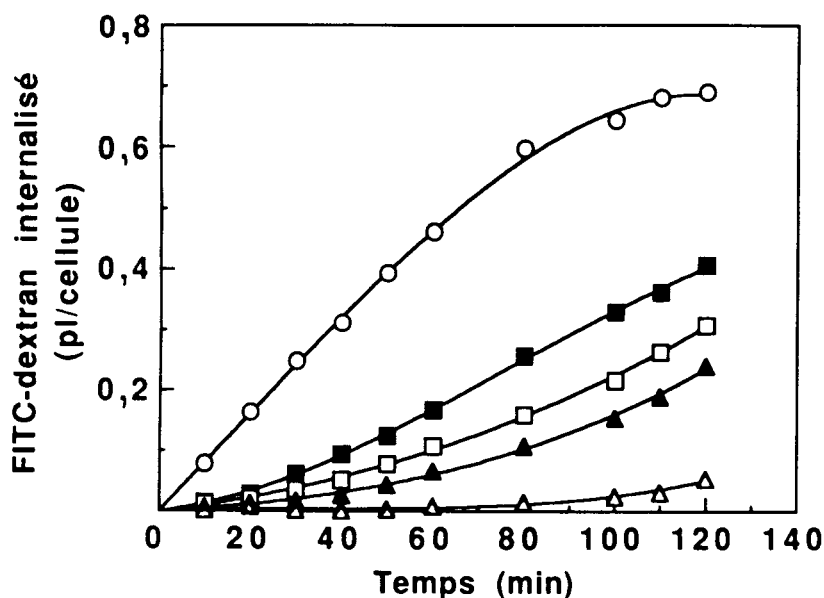
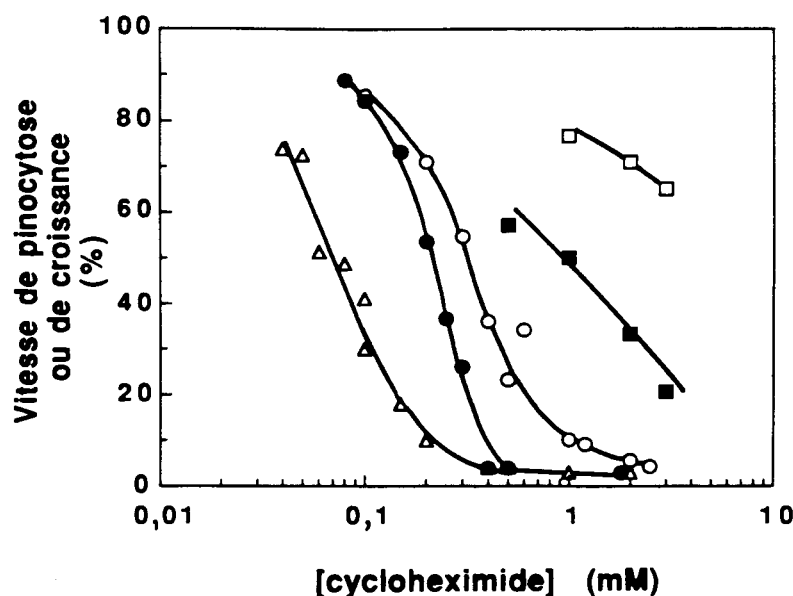


Fig. 17. Inhibition de la pinocytose de phase-fluide par la cycloheximide chez l'amibe *Dictyostelium*. Des amibes *Dictyostelium* de la souche AX2 sont mises en préincubation pendant 30 minutes à 22°C en présence de 0 à 0,5 mM de cycloheximide. Les cinétiques de pinocytose sont démarrées par addition de FITC-dextran à une concentration finale de 2 mg/ml. L'internalisation de FITC-dextran est exprimée en pl de FITC-dextran/cellule. (○) Contrôle sans cycloheximide; (■) 0,1 mM; (□) 0,15 mM; (▲) 0,2 mM et (△) 0,5 mM cycloheximide.

A une concentration 0,1 mM cycloheximide, la vitesse d'entrée du FITC-dextran est inhibée à 70% ; néanmoins, le degré d'inhibition diminue progressivement jusqu'à 40% après une heure d'incubation. Des cinétiques similaires d'inhibition sont observées

avec 0,15, 0,2 et 0,5 mM cycloheximide. Ces résultats indiquent que les cellules sont capables de s'adapter au blocage de la traduction de protéines par la cycloheximide, idée qui a été suggérée par Todorov (1990). A des concentrations plus élevées de cycloheximide (1-3 mM), la pinocytose de phase-fluide est inhibée à plus de 90 % et les cellules n'échappent pas à l'effet inhibiteur de l'antibiotique avec une incubation de 4 heures. L'effet inhibiteur de la cycloheximide sur la pinocytose est également observé avec des amibes mises en incubation dans un tampon non-nutritif, 40 mM MES-Na, pH 6,5. Les pourcentages d'inhibition de la vitesse initiale d'entrée du FITC-dextran en milieu axénique ou dans du tampon MES-Na, sont tracés en fonction de la concentration de cycloheximide (figure 18).



**Fig. 18. Titration de l'inhibition de la pinocytose de phase-fluide et de la croissance axénique chez *Dictyostelium*.** L'inhibition de la pinocytose de phase-fluide est estimée par le calcul de la vitesse initiale d'internalisation de FITC-dextran sur les cinétiques de pinocytose en présence de cycloheximide (voir fig. 17). Le pourcentage de la vitesse initiale d'internalisation rapporté au contrôle sans antibiotique est tracé en fonction de la concentration de cycloheximide: pour la pinocytose dans les souches AX2 (△) et X6 (□) en milieu axénique; et dans la souche AX2 (○) en tampon 40 mM MES-Na, pH 6,5. L'inhibition de la croissance est calculée pendant les premières 48 heures d'incubation avec la cycloheximide en milieu axénique (voir fig. 24) dans les souches AX2 (●) et X6 (■).

L'IC<sub>50</sub> pour l'inhibition de la vitesse initiale d'internalisation de FITC-dextran est de 0,08 et 0,35 mM cycloheximide, dans le milieu axénique et en tampon MES-Na, respectivement.

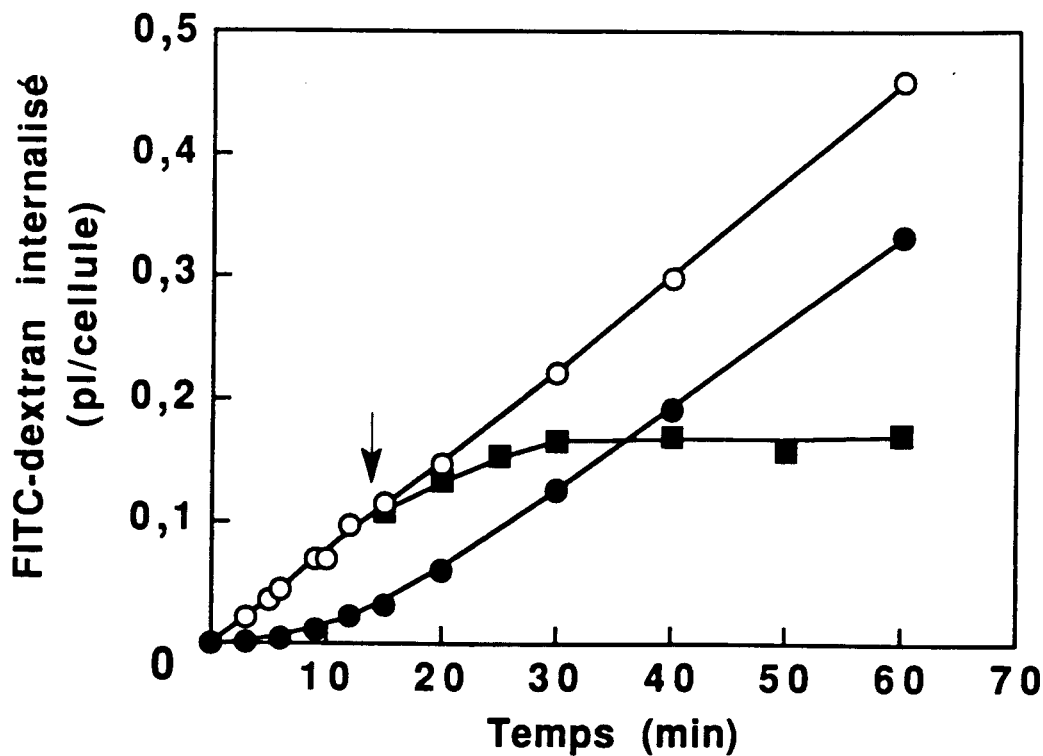
L'effet de la cycloheximide sur la pinocytose de phase-fluide chez la souche mutante X6 résistante à la cycloheximide a été déterminé de façon parallèle aux expériences avec la souche AX2. La souche X6 internalise le FITC-dextran en présence ou en absence de cycloheximide avec une cinétique analogue à celle de la souche AX2. A des concentrations élevées de cycloheximide (3 mM), la pinocytose chez la souche X6 est inhibée seulement à 30 % (figure 18).

Pour déterminer si la résistance à la cycloheximide dans la souche X6 n'est pas associée à une altération de la perméabilité de la membrane plasmique, la sensibilité de cette souche vis-à-vis d'autres inhibiteurs de la pinocytose de phase-fluide chez *Dictyostelium* a été examinée. En présence de 7,5 mM caféine ou 2 mM vanadate, la pinocytose chez X6 est inhibée à 90 % et 65 % respectivement, en accord avec l'inhibition obtenue dans la souche AX2. La résistance du mutant X6 à la cycloheximide n'est pas liée à une altération de la perméabilité de la membrane plasmique.

L'inhibition de la pinocytose de phase-fluide par la cycloheximide n'est pas immédiate. L'installation de l'inhibition est montrée dans la figure 19. Après 15 minutes d'internalisation du FITC-dextran, la cycloheximide, 0,5 mM est ajoutée à une partie aliquote de la suspension d'amibes. On peut observer que l'antibiotique inhibe à 95 % la pinocytose de phase-fluide, 20 minutes après l'addition de l'antibiotique. Ces résultats peuvent s'interpréter dans le sens d'une inhibition de la pinocytose liée à une inhibition de la synthèse de protéines. Finney et al. (1985) ont observé en effet que l'inhibition de la synthèse de protéines chez *Dictyostelium* s'établit en 30 minutes.

L'effet inhibiteur de la cycloheximide sur la pinocytose de phase-fluide est réversible à 100 % pour des périodes courtes d'incubation en présence de l'antibiotique. Des amibes traitées avec 1,0 mM cycloheximide pendant 2 heures sont capables de récupérer la capacité d'internaliser le FITC-dextran après une phase de latence de 10 minutes (figure 19). La cinétique de récupération de la pinocytose est l'image opposée de celle de l'inhibition par la cycloheximide.



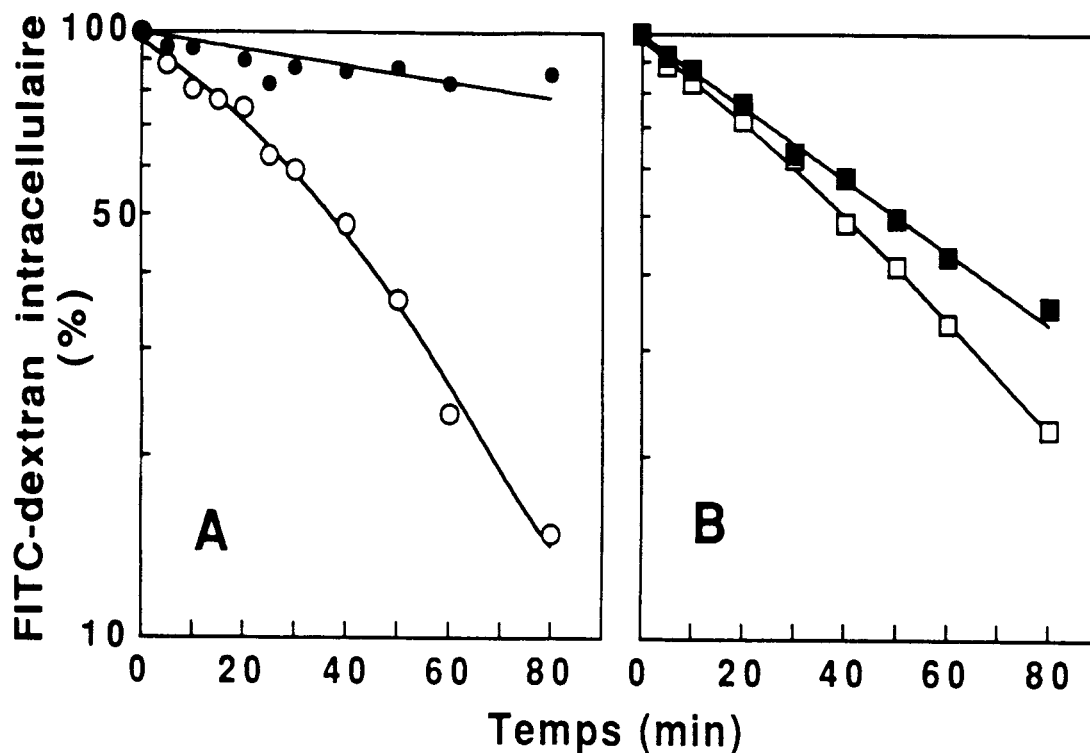


**Fig. 19. Cinétiques d'inhibition et de réversibilité de la pinocytose de phase-fluide par la cycloheximide.** Pour examiner la cinétique d'inhibition de la pinocytose, des amibes de la souche AX2 sont mises en incubation ( $1 \times 10^7$  cellules/ml) à 22°C en milieu axénique avec du FITC-dextran (2 mg/ml) pendant 60 minutes (○). Après 15 minutes d'internalisation du marqueur de phase-fluide (indiqué par la flèche), 0,5 mM cycloheximide est ajouté à une partie aliquote de la suspension d'amibes (■). Pour étudier la réversibilité de l'inhibition, des amibes de la souche AX2 sont mises en incubation pendant 120 minutes avec 2 mM cycloheximide en milieu axénique à 22°C. Après élimination de l'antibiotique du milieu d'incubation, les amibes sont remises en suspension en milieu axénique sans cycloheximide à 22°C avec 2 mg/ml FITC-dextran (●). L'internalisation du FITC-dextran est mesurée en fonction du temps comme décrit dans matériel et méthodes.

Pour contrôler que la cycloheximide ne modifie pas le métabolisme énergétique chez *Dictyostelium*, le niveau d'ATP a été mesuré par la méthode à la luciférine-luciférase dans des cellules traitées avec cet antibiotique. Une suspension d'amibes est mise en incubation ( $1 \times 10^7$  cellules/ml) en tampon 40 mM MES-Na, pH 6,5, avec 2 mM cycloheximide pendant 120 minutes à 22°C. Le niveau d'ATP est mesuré à la fin de l'incubation dans un extrait d'acide perchlorique (voir le chapitre de matériel et méthodes). En absence de cycloheximide le niveau d'ATP mesuré sur trois expériences indépendantes est  $1,37 \pm 0,19$  mM ATP ( $\pm$  S.E.) et dans des cellules traitées avec 2 mM cycloheximide, il est  $1,06 \pm 0,12$  mM ATP. Le niveau d'ATP dans la cellule n'est donc pas modifié de façon significative par la cycloheximide.

### 5.2.b Inhibition de l'exocytose du marqueur de phase fluide de FITC-dextran.

L'effet de la cycloheximide sur l'exocytose du FITC-dextran a été étudié avec des amibes *Dictyostelium* ayant préalablement internalisé le marqueur de phase-fluide en milieu axénique. Les cinétiques d'exocytose de FITC-dextran sont déterminées avec des amibes remises en suspension en milieu nutritif sans FITC-dextran, en absence et en présence de cycloheximide (figure 20).



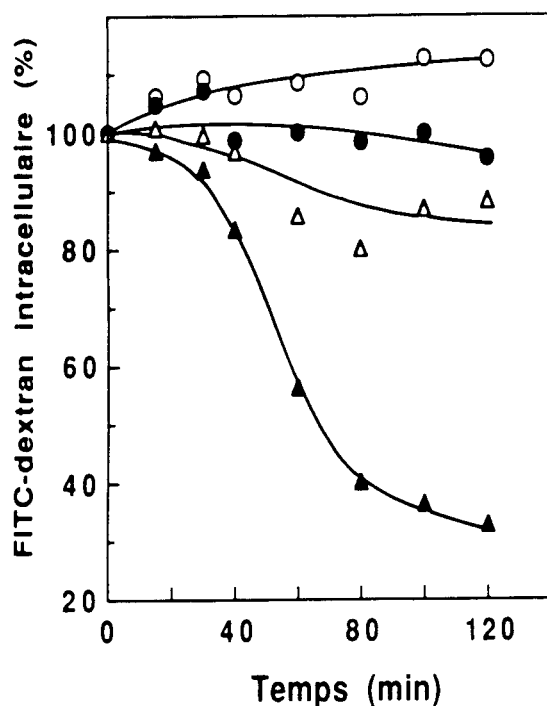
**Fig. 20. Cinétiques d'exocytose du FITC-dextran en présence de cycloheximide.** Le compartiment endosomal des amibes *Dictyostelium*, souches AX2 et X6, est chargé avec du FITC-dextran en milieu axénique pendant 120 minutes ; le volume de marqueur de phase-fluide internalisé est de 0,57 et 0,49 pl/cellule respectivement. Après élimination du FITC-dextran extracellulaire résiduel, les cellules sont remises en suspension dans du milieu axénique sans FITC-dextran, en absence (○, □) et en présence de 0,5 mM cycloheximide (●, ■). Le pourcentage de FITC-dextran intracellulaire est tracé en fonction du temps pour les souches AX2 (○, ●) et X6 (□, ■).

Dans l'expérience contrôle, en absence de l'antibiotique, on observe une latence d'environ 10 minutes, après laquelle l'exocytose du marqueur suit une cinétique de pseudo-premier ordre avec un  $t_{1/2}$  de 25 minutes. En présence de 0,5 mM cycloheximide, l'exocytose de FITC-dextran est fortement inhibée et le  $t_{1/2}$  augmente de 7 à 10 fois par rapport au  $t_{1/2}$  observé dans l'expérience contrôle.

Les mêmes expériences ont été réalisées avec la souche mutante X6, résistante à la cycloheximide. Le  $t_{1/2}$  pour l'exocytose du FITC-dextran n'est pas modifié de façon significative par l'addition de cycloheximide: le  $t_{1/2}$  d'une expérience sans cycloheximide est de 40 minutes et de 49 minutes dans une expérience en présence de 1 mM cycloheximide.

### 5.2.c Effet sur le plateau de la pinocytose.

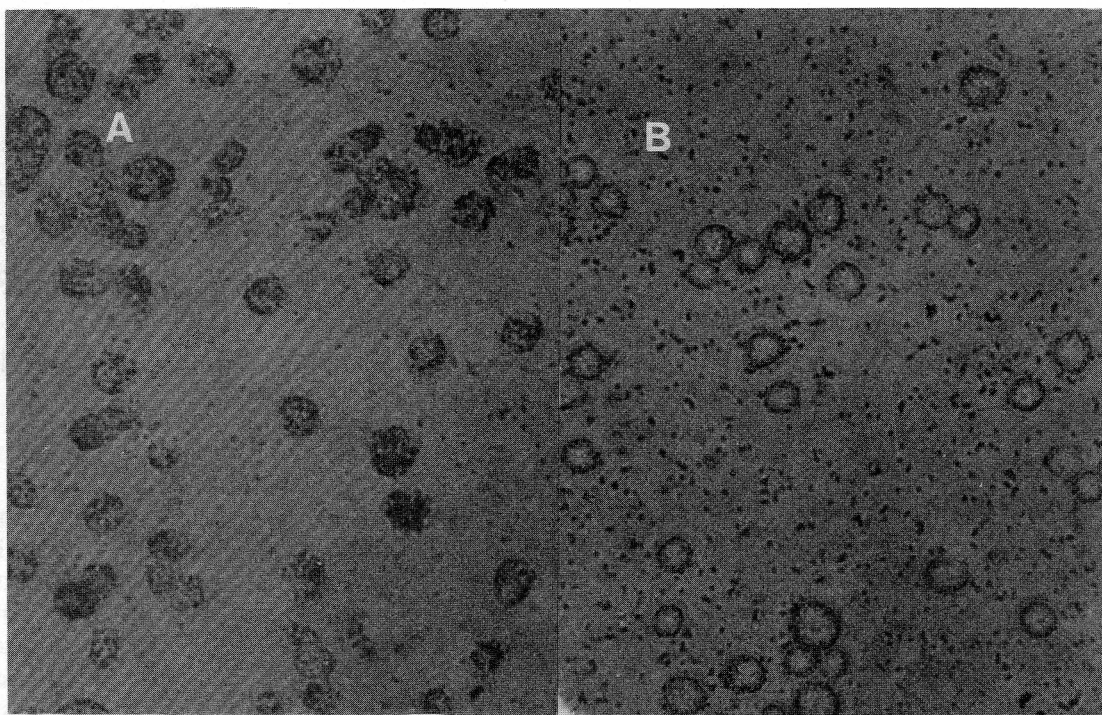
L'effet de la cycloheximide a été analysé sur le plateau de la pinocytose. Après l'addition de cycloheximide aux amibes au plateau de la pinocytose, toujours en présence de FITC-dextran extracellulaire, le marqueur de phase-fluide intracellulaire reste piégé à l'intérieur des cellules. L'exocytose du marqueur de phase-fluide induite par le vanadate est bloquée par la cycloheximide, (figure 21). Dans la souche X6, résistante à la cycloheximide, l'exocytose induite par le vanadate est insensible à l'effet inhibiteur de la cycloheximide.



**Fig. 21. Effet de la cycloheximide et du vanadate sur le plateau de la pinocytose.** Une suspension d'amibes *Dictyostelium*, souche AX2, est mise en incubation avec 2 mg/ml FITC-dextran en milieu axénique à 22°C. Après 150 minutes d'internalisation, le volume de marqueur internalisé est de 0,7 pl/cellule (valeur prise comme 100%). A ce stade, la cycloheximide ou le vanadate ou la cycloheximide plus le vanadate sont ajoutés à des parties aliquotes de la suspension d'amibes et la quantité de FITC-dextran est mesurée en fonction du temps. Les symboles représentent (○) la partie aliquote sans inhibiteur, utilisée comme contrôle; (●) 2 mM cycloheximide; (▲) 2 mM vanadate; (△) 2mM cycloheximide + 2 mM vanadate.

#### 5.2.d Inhibition de la phagocytose de billes carboxylées de latex.

L'effet de la cycloheximide sur la phagocytose a été examiné par l'emploi du test qualitatif de phagocytose de Duffy et Vogel (1984). Dans l'expérience contrôle, où les amibes sont mises en incubation pendant 20 minutes avec des billes de latex carboxylées, en milieu axénique en absence de cycloheximide, les cellules observées sous un microscope de contraste de phase sont totalement remplies de particules de latex et apparaissent foncées (figure 22A). Les cellules mises en incubation pendant 20 minutes en agitation, en milieu axénique en présence de 1 mM cycloheximide apparaissent claires, sans particules de latex à l'intérieur (figure 22B). Cette inhibition de la phagocytose de billes de latex par la cycloheximide est en accord avec les travaux de Dimond et al. (1981) qui montrent une inhibition de la phagocytose par la cycloheximide.



**Fig. 22. Inhibition de la phagocytose chez *Dictyostelium* par la cycloheximide.** Des amibes *Dictyostelium* ( $4 \times 10^6$  cellules/ml) souche AX2, sont mises en incubation en milieu axénique à 22°C pendant 30 minutes sans (A) ou avec 1 mM cycloheximide (B). Des particules de latex carboxylées (6  $\mu$ l/ml) sont ajoutées au milieu d'incubation. Des photos d'amibes observées sous un microscope de contraste de phase (x 500), sont prises 20 minutes après addition des particules de latex.

D'autres antibiotiques: l'anisomycine, l'émétine ou la puromycine, qui inhibent la synthèse de protéines, inhibent aussi d'une manière efficace la phagocytose de particules de latex chez *Dictyostelium*.

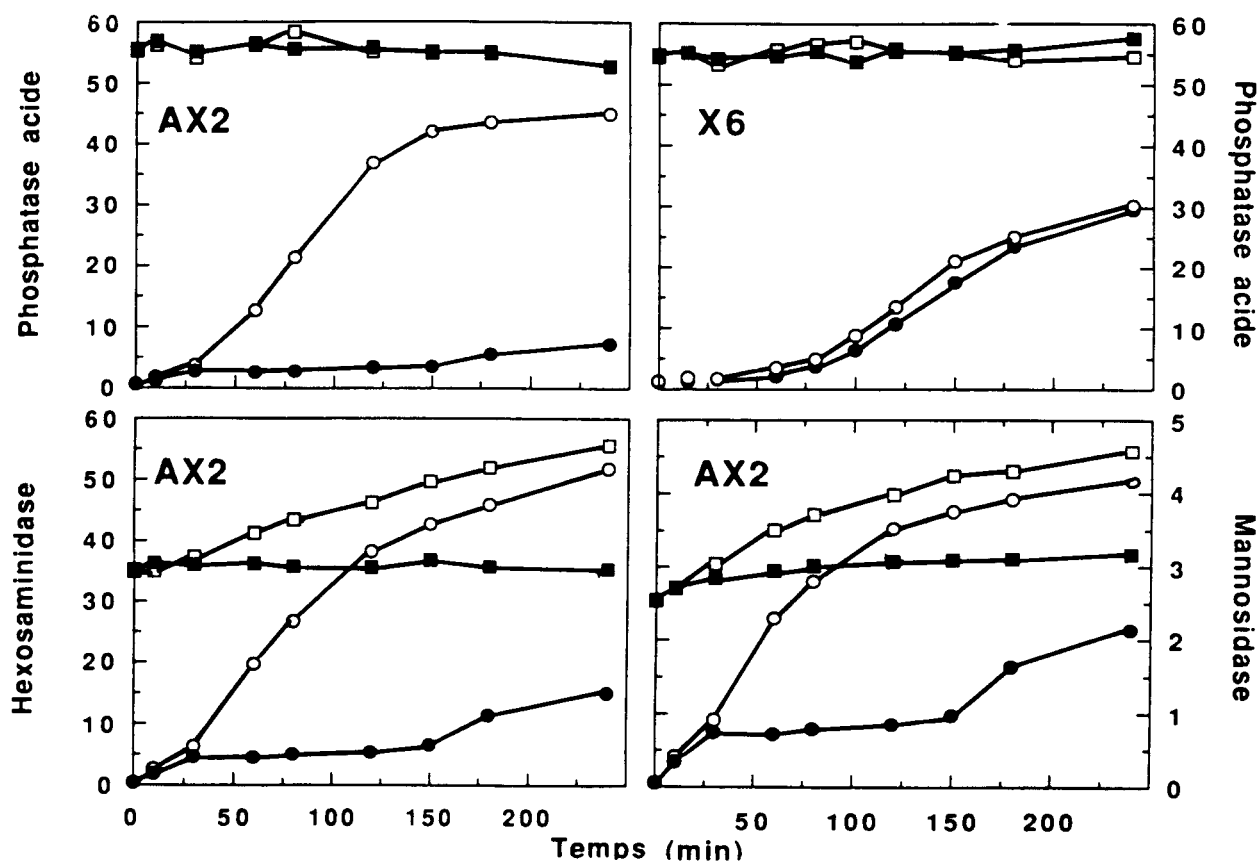
La phagocytose de particules carboxylées de latex, chez le mutant X6, n'est pas inhibée par la cycloheximide à une concentration de 1 mM.

#### **5.2.e Inhibition de la sécrétion des enzymes lysosomales.**

La sécrétion de trois hydrolases lysosomales: la phosphatase acide, la N-acétylhexosaminidase et l' $\alpha$ -mannosidase, stimulée par 0,1 M saccharose a été examinée. En présence de 1 mM cycloheximide, l'étape rapide de sécrétion de la phosphatase acide est supprimée et elle reste linéaire en fonction du temps. Dans ces conditions, 15 % seulement de l'activité phosphatase acide se trouvent dans le milieu extracellulaire après 4 heures d'incubation. Ces résultats sont en accord avec ceux de Dimond et al. (1981) qui ont aussi étudié la sécrétion non-stimulée de phosphatase acide en présence de cycloheximide et en absence de saccharose.

Les cinétiques de sécrétion de la N-acétylhexosaminidase et de l' $\alpha$ -mannosidase sont aussi fortement inhibées par la cycloheximide. Après 4 heures d'incubation en présence de l'antibiotique, seulement 27 % et 47 % de l'activité N-acétylhexosaminidase et de l' $\alpha$ -mannosidase respectivement sont extracellulaires. Dimond et al. (1981) ont également étudié la sécrétion de ces deux glycosidases, en présence de cycloheximide mais en absence de sucre non-métabolisable stimulateur. Dans ces conditions, ils n'ont pas observé d'inhibition de la sécrétion par cet antibiotique.

Pour la cinétique de sécrétion de la N-acétylhexosaminidase et de l' $\alpha$ -mannosidase, on observe une augmentation significative des activités enzymatiques totales (intra- plus extracellulaires) en fonction du temps d'incubation en absence de cycloheximide. La cycloheximide comme le vanadate (Klein et al., 1989) empêchent cette augmentation des activités enzymatiques. Un comportement similaire est décrit pour la sécrétion de la N-acétylhexosaminidase chez *Tetrahymena pyriformis* (Banno et al., 1987). En contraste à ce comportement, aucune augmentation de l'activité enzymatique totale n'est observée pour la phosphatase acide.



**Fig.23. Cinétique d'inhibition de la sécrétion des enzymes lysosomales chez l'amibe *Dictyostelium*.** Des amibes *Dictyostelium*, souches AX2 et X6, sont mises en incubation à 22°C dans du tampon 20 mM MES-Na, pH 6,5, contenant 0,1 M saccharose en absence (○, □) ou en présence (●, ■) de 1 mM cycloheximide. Les activités enzymatiques sont déterminées au cours du temps dans le milieu extracellulaire (○, ●) et dans le total (□, ■) et sont exprimées en nmol/min/ml.

Chez la souche mutante X6, les cinétiques de sécrétion de la phosphatase acide ou de la N-acétylhexosaminidase stimulées par le saccharose ne sont pas affectées par la cycloheximide. Cependant, chez le mutant X6, le niveau de sécrétion de phosphatase acide en absence de cycloheximide est plus faible que dans la souche AX2. Chez le mutant X6, 50% de l'activité totale de phosphatase acide sont sécrétés dans le milieu extracellulaire après 4 heures d'incubation, valeur à comparer à 85% sécrétés par la souche AX2 pour le même temps. (figure 23). La même observation est faite pour la sécrétion de la N-acétylhexosaminidase. Cette différence dans le profil de sécrétion des enzymes lysosomales peut être liée à la différence des souches parentales entre les souches AX2 et X6 (tableau 1 du chapitre Matériel et Méthodes).

### 5.3 Effet de la cycloheximide sur la croissance axénique

J'ai examiné l'effet de la cycloheximide sur la croissance de *Dictyostelium* en milieu axénique (figure 24). Des concentrations de 0,2 et 0,3 mM de cycloheximide inhibent la croissance de *Dictyostelium* pendant les premières 48 heures, après lesquelles les cellules reprennent une vitesse de croissance comparable à celle d'une expérience sans antibiotique jusqu'au même plateau que les cellules sans cycloheximide. Ainsi, les amibes échappent à l'effet inhibiteur de la cycloheximide à des doses sous létales. Cet effet d'échappement rappelle l'effet analogue qui se produit dans la phase initiale de la pinocytose de phase fluide en présence de faibles concentrations de cycloheximide (0,1-0,2 mM). L'inhibition totale de la croissance s'observe pour 0,5 mM cycloheximide, et entraîne une lyse cellulaire (avec un  $t_{1/2}$  d'environ 100 heures) attendue comme conséquence de l'inhibition de la synthèse de protéines et de l'incapacité d'internaliser des nutriments.

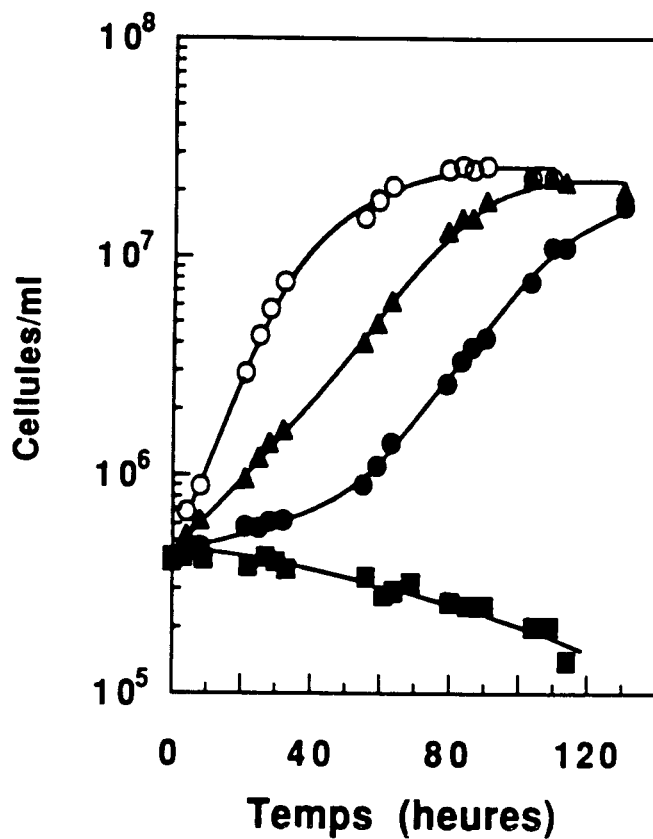


Fig. 24. Effet de la cycloheximide sur la croissance de l'amibe *Dictyostelium*. Des amibes *Dictyostelium*, souche AX2, sont mises en suspension à 22°C en milieu axénique contenant différentes concentrations de cycloheximide: (○) 0 mM; (▲) 0,2 mM; (●) 0,3 mM et (■) 0,5 mM.

La courbe de titration de l'inhibition de la croissance par la cycloheximide dans la souche AX2 est représentée dans la figure 18. Le calcul de la vitesse de croissance est fait en tenant compte des premières 48 heures d'inhibition. L' $IC_{50}$  pour l'inhibition de la

croissance en milieu axénique est de 0.25 mM cycloheximide. On constate que les concentrations nécessaires pour inhiber la croissance en milieu axénique et la pinocytose de phase-fluide sont du même ordre de grandeur.

Le profil de croissance de la souche X6 de *Dictyostelium* est équivalent à celui de la souche AX2. Les cellules poussent avec un temps de doublement de  $9,5 \pm 0,6$  heures (moyenne  $\pm$  S.E.,  $n = 4$ ) et la densité cellulaire au plateau est de  $(1,25 \pm 0,2) \times 10^7$  cellules/ml. L'IC<sub>50</sub> pour l'inhibition de la croissance du mutant X6 par la cycloheximide en milieu axénique est d'environ 1 mM, la souche X6 est donc 4 fois plus résistante à la cycloheximide que la souche AX2.

L'effet inhibiteur de la cycloheximide sur la croissance en milieu axénique est un processus réversible. Si les amibes *Dictyostelium*, souche AX2, sont mises en incubation avec 2 mM cycloheximide pendant 2 heures, puis lavées pour éliminer l'antibiotique, leur croissance s'effectue de la même façon que des cellules non-traitées avec la cycloheximide. Ce résultat peut s'interpréter en accord avec le fait que l'inhibition de la synthèse de protéines par la cycloheximide est un processus réversible (Ratner et al., 1989).

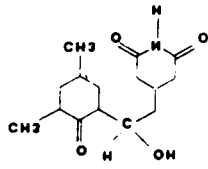
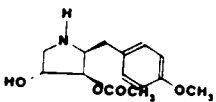
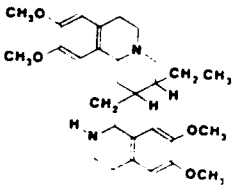
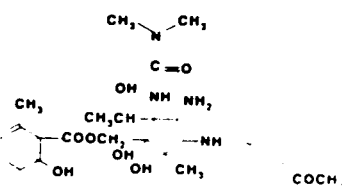
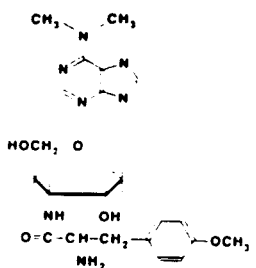
#### **5.4 Effet d'autres inhibiteurs de la synthèse de protéines sur la pinocytose de phase-fluide.**

La question examinée ici est de savoir si l'inhibition de la pinocytose de phase fluide par la cycloheximide est un effet particulier de cet antibiotique ou si c'est un effet relié à la synthèse de protéines. Pour répondre à cette question, j'ai analysé l'action d'autres inhibiteurs de la synthèse de protéines qui possèdent des structures diverses: l'anisomycine, l'émétine, la pactamycine et la puromycine, sur la pinocytose de phase-fluide chez *Dictyostelium*. Ces antibiotiques inhibent la synthèse de protéines chez l'amibe *Dictyostelium* (Ratner et al., 1989; Singleton et al., 1988) par des mécanismes d'action différents de celui de la cycloheximide (tableau 5).

Tous les antibiotiques testés inhibent de manière efficace la pinocytose de phase-fluide chez *Dictyostelium* et possèdent des cinétiques d'inhibition similaires à celle de la cycloheximide, sauf la puromycine qui présente une cinétique plus lente. Dans tous les cas, l'inhibition de la pinocytose de phase-fluide est réversible après élimination de l'inhibiteur du milieu d'incubation (tableau 6).



**Tableau 5. Mode d'action des antibiotiques qui inhibent la synthèse de protéines chez *Dictyostelium*.**

<u>INHIBITEUR</u>	<u>ETAPE D'INHIBITION</u>	<u>MODE D'ACTION</u>
<p><b>Cycloheximide</b></p> 	élongation (60 S)	La cycloheximide agit sur la translocation de la chaîne peptidique, du site A au site P, qui dépend du facteur EF-2 et du GTP. Les polysomes sont stabilisés par arrêt du mouvement du ribosome. L'inhibiteur n'induit ni le détachement des chaînes polypeptidiques en cours de synthèse, ni la destruction des polysomes existants.
<p><b>Anisomycine</b></p> 	élongation (60S)	L'anisomycine bloque la transpeptidation en inhibant la peptidyltransférase. Les polysomes sont stabilisés par arrêt du mouvement du ribosome.
<p><b>Éméline</b></p> 	élongation (40 S)	L'émétine empêche la translocation du peptidyl-tARN du site A au site P. Elle stabilise les ribosomes à l'état de polysomes. Il semble possible que le complexe éméline-ribosome (80S) soit incapable d'accepter les aminoacyl-tARN.
<p><b>Pactamycine</b></p> 	initiation (40 S)	La pactamycine semble s'attacher sur la sous-unité 30S et rendrait le ribosome 70S instable. La pactamycine provoque la libération du N acétyl-L-phénylalaninyl-tARN à partir du ribosome.
<p><b>Puromycine</b></p> 	élongation (60 S)	La puromycine fixe par son groupe α-aminé le carbone terminal de la formylméthionine (fMet) ou du peptide en voie de croissance qui vient de se détacher de son tARN lui-même fixé au site P. Le complexe peptidique fMet puromycine ou peptidyl-puromycine ainsi formé se détache du ribosome.

**Tableau 6. Temps d'établissement et de récupération de l'inhibition de la pinocytose de phase-fluide chez *Dictyostelium*, AX2, en présence de divers inhibiteurs de la synthèse de protéines.**

Inhibiteur	inhibition (min)	récupération (min)
cycloheximide (1 mM)	10	10
anisomycine (0,4 mM)	20	25
émétine (1,5 mM)	20	10
puromycine (0,9 mM)	>100	>120

L'établissement de l'inhibition de la pinocytose de phase-fluide est examiné avec des amibes *Dictyostelium*, souche AX2, mises en incubation à une concentration cellulaire de  $1 \times 10^7$  cellules/ml à 22°C dans du milieu axénique. La cinétique d'inhibition est suivie par l'internalisation du FITC-dextran, comme montré dans la figure 19 pour la cycloheximide.

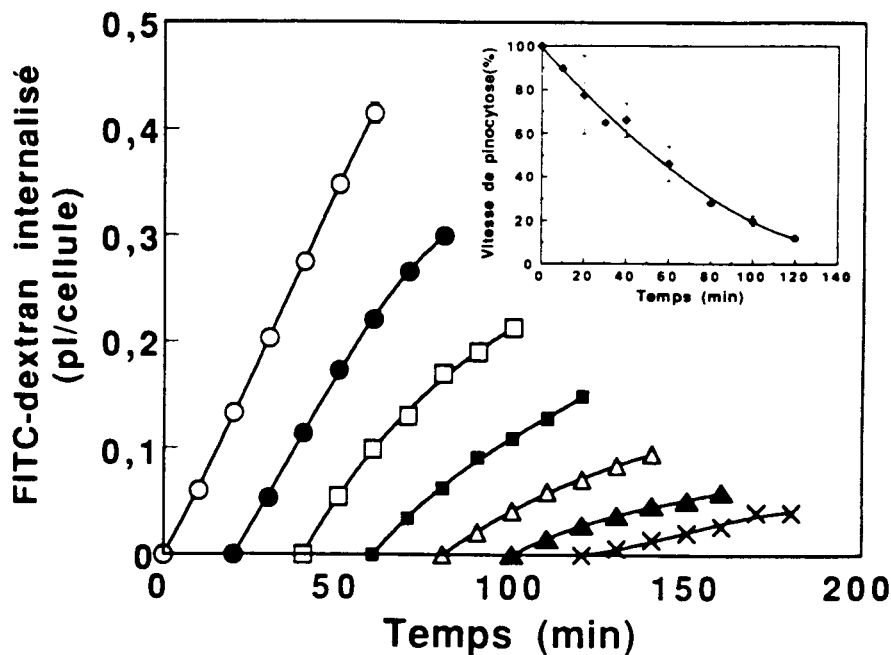
Pour étudier la réversibilité de l'inhibition, des amibes de la souche AX2 sont mises en incubation pendant 2 heures avec les concentrations indiquées de chaque antibiotique, en milieu axénique à 22°C. Après élimination de l'antibiotique du milieu d'incubation, les amibes sont remises en suspension en milieu axénique sans inhibiteur à 22°C avec 2 mg/ml FITC-dextran.

La croissance axénique des souches AX2 et X6 est inhibée par ces antibiotiques, dans la même gamme de concentration que la pinocytose de phase-fluide (Tableau 7). Le même effet d'échappement à l'effet inhibiteur des antibiotiques est observé avec l'anisomycine, l'émétine et la puromycine dans les souches AX2 et X6.

L'ensemble de ces résultats montre que l'effet inhibiteur de la cycloheximide sur l'endocytose n'est pas un effet exclusif de cet antibiotique, mais plutôt un effet commun aux antibiotiques qui inhibent la synthèse de protéines chez *Dictyostelium*.

L'effet inhibiteur de la puromycine sur la pinocytose de phase-fluide a été étudié plus en détail, étant donné que cet antibiotique a une cinétique d'inhibition ralentie par rapport à celle des autres antibiotiques testés (figure 25). Le temps d'inhibition de la pinocytose de phase-fluide par la puromycine a été étudié avec des amibes *Dictyostelium*, souche AX2, mises en incubation en milieu axénique contenant 0,9 mM puromycine. Comme montré dans la figure 25, l'inhibition de la pinocytose, mesurée par la vitesse

initiale d'internalisation du FITC-dextran, est tracée en fonction du temps d'incubation en présence de cet antibiotique. L'inhibition de la pinocytose s'établit progressivement avec un  $t_{1/2}$  de 50 minutes. Par ailleurs, la cinétique de réversibilité de l'effet inhibiteur de la puromycine a été étudiée avec des amibes mises en incubation pendant 120 minutes en milieu axénique contenant 0,9 mM de puromycine, puis les cellules sont lavées afin d'éliminer l'antibiotique et remises en suspension dans un milieu sans inhibiteur. La capacité d'internaliser le FITC-dextran est retrouvée avec un  $t_{1/2}$  de 60 minutes.



**Fig. 25. Inhibition de la pinocytose de phase-fluide par la puromycine chez *Dictyostelium* souche AX2.** Des amibes, souche AX2, sont mises en incubation à 22°C en milieu axénique avec 0,9 mM puromycine. A intervalles de 20 minutes, la cinétique de pinocytose de phase-fluide est mesurée par l'addition de 2 mg/ml FITC-dextran. La quantité de marqueur de phase-fluide internalisé est tracée en fonction du temps. Les symboles employés pour les temps d'incubation avec la puromycine avant l'addition du FITC-dextran sont les suivants: (●) 20; (□) 40; (■) 60; (△) 80; (▲) 100 et (x) 120 min. Le contrôle sans puromycine est représenté par (○). La courbe insérée à l'angle indique le pourcentage de la vitesse initiale de pinocytose en fonction du temps d'incubation avec la puromycine avant l'addition du FITC-dextran.

L'effet de la puromycine chez *Dictyostelium* est à comparer avec l'inhibition de la pinocytose par le même antibiotique chez *Amoeba proteus* (Sanders et Bell, 1970). Dans ce système, la pinocytose est inhibée de façon efficace (90%) par 0,03 mM puromycine après des périodes prolongées d'incubation (4 h). Pour des traitements de 2 h, l'inhibition de la pinocytose n'est pas complète et la synthèse protéique est inhibée seulement à 50%. L'inhibition de la pinocytose est réversible, une récupération de l'activité pinocytaire s'observe 3 h après l'élimination de l'antibiotique.

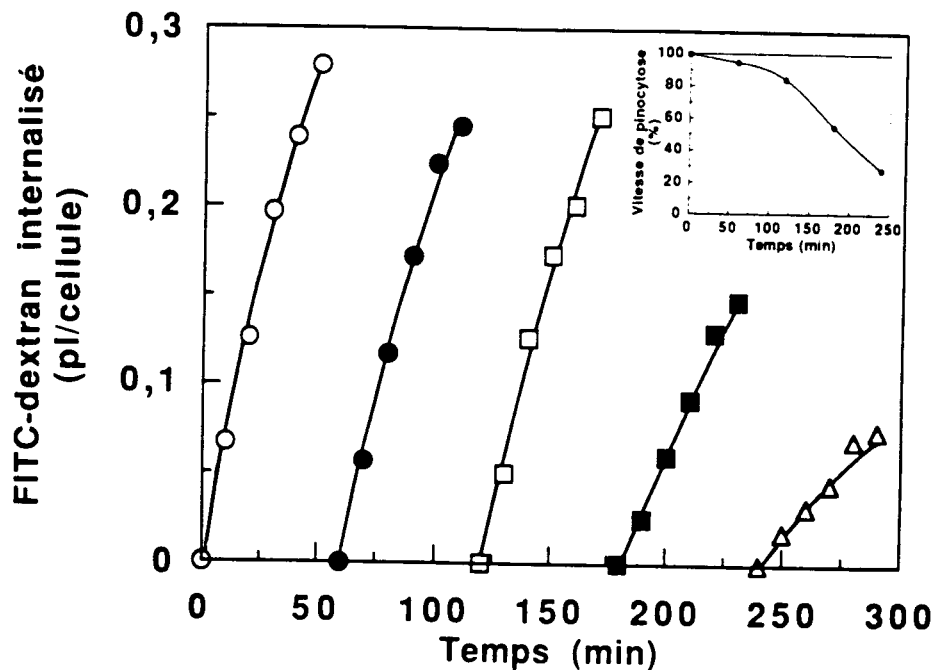
La sensibilité de la croissance et de la pinocytose de la souche mutante X6 de *Dictyostelium*, résistante à la cycloheximide, a été examinée avec les antibiotiques qui inhibent les deux processus dans la souche AX2. La souche X6 est sensible à l'anisomycine et à l'émétine dans la même gamme de concentration que la souche AX2 (tableau 7), néanmoins, la souche X6 est très faiblement inhibée par la puromycine. Dans la figure 26, on observe l'inhibition de la pinocytose de phase-fluide en fonction du temps d'incubation en présence de cet antibiotique.

**Tableau 7. Inhibition de la pinocytose de phase-fluide et de la croissance axénique par des inhibiteurs de la synthèse de protéines chez l'amibe *Dictyostelium*.**

Souche Inhibiteur	AX2		X6	
	Pinocytose <sup>(a)</sup> IC <sub>50</sub> (mM)	Croissance <sup>(b)</sup>	Pinocytose <sup>(a)</sup> IC <sub>50</sub> (mM)	Croissance <sup>(b)</sup>
cycloheximide	0,08	0,25	>3,0	1,0
anisomycine	0,15	0,75	0,5	0,5
émétine	1,0	1,90	1,0	1,9
pactamycine	<0,9	<0,90	ND <sup>(c)</sup>	ND
puromycine	0,25	0,10	ND	0,2

(a) Les amibes *Dictyostelium*, souches AX2 ou X6 sont mises en préincubation ( $1 \times 10^7$  cellules/ml) à 22°C pendant 30 minutes en milieu axénique contenant les antibiotiques dans les gammes de concentrations suivantes: 0 - 3 mM cycloheximide, 0 - 2,8 mM anisomycine, 0 - 2 mM émétine ou 0,9 mM pactamycine. Pour la puromycine, le temps de préincubation est de 4 heures. La pinocytose de phase-fluide est mesurée par l'internalisation de FITC-dextran en présence de l'inhibiteur. La pactamycine à une concentration de 0,9 mM provoque une inhibition supérieure à 95%. (b) L'inhibition de la croissance est mesurée sur les courbes de croissance pendant les premières 48 heures pour tous les antibiotiques, sauf pour la puromycine où l'inhibition apparaît après 30 heures d'incubation en présence de l'antibiotique. Avec 0,9 mM puromycine l'inhibition de la croissance est totale. (c) ND : Valeur non-déterminée

La cinétique d'inhibition de la pinocytose par la puromycine chez le mutant X6 est 3 fois plus lente que celle de la souche AX2, et le  $t_{1/2}$  pour l'établissement de l'inhibition est d'environ 180 minutes avec 0,9 mM puromycine. Ces résultats montrent que la souche X6 est partiellement résistante à l'inhibition par la puromycine.



**Fig. 26. Inhibition de la pinocytose de phase-fluide par la puromycine chez *Dictyostelium* souche X6.** Des amibes, de la souche X6, sont mises en incubation à 22°C en milieu axénique avec 0,9 mM puromycine. A intervalles de 60 minutes, la cinétique de pinocytose de phase-fluide est mesurée par l'addition de 2 mg/ml FITC-dextran. La quantité de marqueur de phase-fluide internalisé est tracée en fonction du temps. Les symboles employés pour les temps d'incubation avec la puromycine avant l'addition du FITC-dextran, sont: (●) 60; (□) 120; (■) 180 et (△) 240 min. Le contrôle sans puromycine est représenté par (○). La courbe insérée à l'angle indique le pourcentage de la vitesse initiale de pinocytose en fonction du temps d'incubation avec la puromycine avant l'addition du FITC-dextran.

Des inhibiteurs de la synthèse protéique mitochondriale comme le chloramphénicol ou l'érythromycine, testés à des doses de 0,25-1,0 mg/ml n'ont aucun effet sur l'internalisation du marqueur de phase fluide, FITC-dextran.

## 5.5 Discussion.

La cycloheximide est un antibiotique qui inhibe la synthèse protéique chez les cellules eucaryotes et inhibe rapidement l'endocytose chez l'amibe *Dictyostelium discoideum*.

D'autres antibiotiques qui inhibent la synthèse de protéines chez *Dictyostelium* : l'anisomycine, l'émétine, la pactamycine et la puromycine, qui possèdent des structures et mode d'action divers, sont aussi efficaces pour inhiber l'endocytose chez *Dictyostelium*. Ce fait suggère que l'inhibition de l'endocytose est reliée à l'inhibition de la synthèse de protéines.

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer comment l'inhibition de la synthèse protéique inhibe l'endocytose: une interprétation directe de ces résultats pourrait être un besoin constant de protéine(s) sensible(s) à la cycloheximide durant l'endocytose. Vu l'action rapide de cet antibiotique, la (es) protéine(s) impliquée(s) devrait(ent) avoir une vitesse de renouvellement inférieure à 10 minutes.

Une autre hypothèse pour expliquer l'effet inhibiteur de la cycloheximide, est de considérer l'endocytose comme un processus régulé par des protéines critiques ayant différents états de phosphorylation. Dans plusieurs types cellulaires, le traitement avec la cycloheximide provoque des changements de l'état de phosphorylation de certaines protéines (Crête et Landry, 1990; Kozma et al., 1989; Price et al., 1989). L'idée d'une régulation de l'endocytose par un mécanisme de phosphorylation semble intéressante parce que normalement, la forme phosphorylée de plusieurs enzymes est plus active que la forme non-phosphorylée. Un exemple bien caractérisé est la phosphorylation de la S6 kinase dans le tissu de foie de rat activée par la cycloheximide. La S6 est la seule phosphoprotéine (70 kDa) de la sous unité 40S du ribosome eucaryote dont la phosphorylation déclenche ou facilite la synthèse de protéines, réponse primaire de la croissance cellulaire (Price et al., 1989). Un effet de phosphorylation par la cycloheximide et la puromycine est paradoxal, par le fait que ces agents sont des inhibiteurs de la synthèse de protéines. Une augmentation de la phosphorylation de la S6 kinase est aussi observée avec des rats traités avec l'insuline et le vanadate (Kozma et al., 1988; Price et al., 1989).

Un autre mécanisme de phosphorylation qui semble réguler l'endocytose est celui qui implique la protéine kinase p34<sup>cdc2</sup> du cycle cellulaire. Cette kinase est très conservée des levures à l'homme et joue un rôle clé dans le contrôle du cycle cellulaire. Cette protéine

est la sous-unité catalytique d'un complexe avec des cyclines. La p34<sup>cdc2</sup> régule la progression des cellules au long du cycle de division cellulaire. Des événements comme la croissance cellulaire, la réplication du DNA et la mitose sont coordonnés à travers des états de phosphorylation de cette kinase. La protéine kinase p34<sup>cdc2</sup> est phosphorylable sur des résidus thréonine et tyrosine. Le motif qui reconnaît la p34<sup>cdc2</sup> kinase sur ses divers substrats est la présence d'un résidu proline, immédiatement après la phosphorylation sur des résidus sérine ou thréonine (pour revue Draetta, 1990).

Le nombre de cibles de la kinase p34<sup>cdc2</sup> est actuellement en constante progression et il a été démontré que cette kinase est impliquée dans les processus de trafic membranaire. Pendant la mitose, le transport de vésicules membranaires impliquant des vésicules d'endocytose est inhibé (Berlin et Oliver, 1980; Warren, 1985; Maeda, 1988). Tuomikoski et al., (1989) ont montré que dans un système acellulaire la fusion de vésicules du trafic membranaire préparées à partir de cellules BHK ("baby hamster kidney cells") est inhibée par des extraits mitotiques de *Xenopus*. Ces résultats font voir que les événements précoces dans la fusion de vésicules sont sous le contrôle de la kinase p34<sup>cdc2</sup>. Le modèle de Todorov (1990) suggère que les cellules traitées avec des doses sous létales de cycloheximide développent un système capable de rétablir l'homéostasie avec des événements similaires à ceux qui s'effectuent dans des cellules qui sont en cours de réplication dans le cycle cellulaire. Ce modèle vient appuyer l'hypothèse d'une régulation de l'endocytose par la p34<sup>cdc2</sup> kinase.

D'une manière alternative, l'effet des inhibiteurs de la synthèse des protéines sur l'endocytose pourrait représenter un processus plus complexe de stress cellulaire; par exemple la cycloheximide induit l'apoptose chez les cellules HL-60 (Martin et al., 1990). L'apoptose est le processus de mort cellulaire caractérisée par une activation des endonucléases probablement due à une augmentation du Ca<sup>2+</sup> cytosolique (Orrenius et al., 1989).

La cible moléculaire responsable de l'inhibition de l'endocytose par la cycloheximide chez *Dictyostelium* reste à déterminer.

**LE pH ENDOSOMAL**



## 6.1 Introduction

Une caractéristique essentielle des compartiments de la voie endocytaire est leur pH acide. La mesure du pH des différents compartiments acides dans la cellule est donc indispensable pour la compréhension du rôle de l'acidification dans les différents processus endocytaires.

Depuis le travail d'Ohkuma et Poole (1978) qui ont mesuré le pH lysosomal par l'emploi du FITC-dextran, cette sonde est devenue un outil classique pour la mesure du pH des compartiments intracellulaires acides. Le FITC-dextran a été employé comme une sonde de pH dans des cellules qui possèdent une importante activité endocytaire, par exemple chez le macrophage (pH lysosomal 4,8 ; Ohkuma et Poole, 1978 ; Geisow, 1984 ; Geisow et Evans, 1984) ; chez *Entamoeba histolytica* (pH endosomal 5,5 ; Aley et al., 1984 ; Löhden-Bendinger et Bakker-Grunwald, 1990) et plus récemment dans la souche AX3 de *Dictyostelium* (pH 5,4 ; Cardelli et al., 1989).

Le FITC-dextran remplit la plupart des critères indispensables pour une sonde de pH dans les compartiments intracellulaires acides (Ohkuma, 1989). Le FITC-dextran est une sonde spécifiquement internalisée par endocytose, elle est très fluorescente en milieu alcalin et peu fluorescente en milieu acide et sa sensibilité étant conservée dans des conditions *in vivo* (voir figures 3 et 4 de Matériel et Méthodes). En solution aqueuse, à pH  $\approx 7,0$ , les formes qui prédominent sont le monoanion et le dianion ce qui permet un calcul simple du pH à partir d'une seule constante de protonation et indépendamment de la concentration de la sonde (Geisow, 1984). Le FITC-dextran est une molécule hydrophile qui ne traverse pas les membranes biologiques (Ohkuma, 1989). La sonde n'est pas dégradée par les enzymes lysosomales, fait qui assure sa localisation dans les compartiments de la voie endocytaire. Les changements de pH sont détectés très rapidement avec le FITC-dextran, ce qui permet une mesure continue des variations de pH à l'intérieur des compartiments acides.

Dans ce chapitre, j'ai mesuré le pH endosomal sondé par le FITC-dextran au plateau de la pinocytose et j'ai étudié l'effet des bases faibles et d'autres agents capables d'abolir le gradient de pH entre les compartiments endocytaires et le cytosol. J'ai exploré les compartiments acides lors des cinétiques de pinocytose et d'exocytose ainsi que pendant les étapes initiales de l'exocytose. Enfin, j'ai déterminé le pH endosomal lors du programme de différenciation cellulaire.

## **6.2 Le pH endosomal au plateau de la pinocytose.**

Le pH endosomal chez *Dictyostelium* a été mesuré après 3 heures d'internalisation de FITC-dextran en milieu axénique. A ce stade, au moins 80% du volume endocyttaire est occupé par le marqueur de phase-fluide. Dans ces conditions, le pH est  $5,8 \pm 0,2$  ( $n=5$ ,  $\pm$  S.E.). Cette valeur représente le pH moyen de l'ensemble des compartiments acides sondables par le FITC-dextran ; en d'autres termes, le pH mesuré à ce stade correspond à un pH endo-lysosomal. La valeur de pH endosomal chez *Dictyostelium* est indépendante de la concentration de FITC-dextran (1 à 10 mg/ml), et de la quantité de cellules ( $8 \times 10^5$  à  $1,5 \times 10^7$  cellules/ml), lors de la mesure de fluorescence.

Le pH endosomal chez *Dictyostelium* est à rapprocher de celui trouvé dans les endosomes de cellules eucaryotes supérieures, par exemple les cellules CHO : pH 5,2 - 5,8, (Yamashiro et Maxfield, 1988). Cardelli et al. (1989) ont trouvé dans la souche AX3 de *Dictyostelium* un pH 5,4 pour le compartiment endo-lysosomal mesuré avec le FITC-dextran, valeur qui est légèrement différente de celle que j'ai mesurée dans la souche AX2.

### **6.2.a Dépendance du pH extérieur.**

Le pH des compartiments de la voie d'endocytose varie avec le pH externe selon le type cellulaire. Par exemple, chez le macrophage de souris, Poole et Ohkuma (1981) ont trouvé que le pH lysosomal dépend légèrement du pH externe. Chez *Entamoeba histolytica*, un organisme avec une grande capacité de pinocytose, il existe une controverse sur l'influence du pH externe sur le pH endosomal. Aley et al. (1984) ont trouvé que le pH endosomal est en équilibre avec le pH du milieu externe. Inversement, Löhden-Bendinger et Bakker-Grunwald (1990) ont trouvé que dans ces cellules le pH endosomal est indépendant du pH externe.

Afin d'examiner l'influence du pH du milieu externe sur le pH endosomal chez *Dictyostelium*, j'ai fait varier le pH, tant du milieu d'incubation lors de la charge avec le FITC-dextran que celui du tampon de mesure.

Tout d'abord les amibes ont été mises en incubation dans du milieu axénique ajusté à différents pH entre pH 5,1 et pH 7,0 en présence de FITC-dextran. Le pH endosomal est mesuré immédiatement après lavage et remise en suspension des amibes dans un tampon

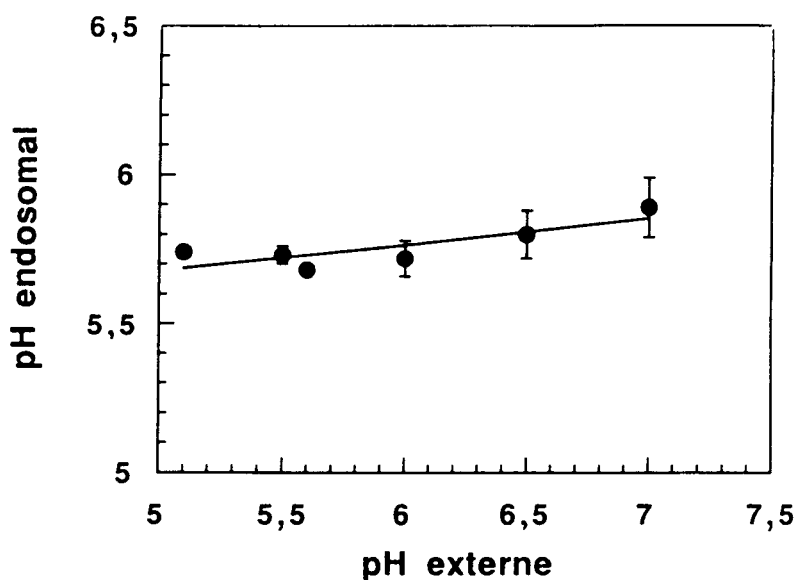
40 mM MES-Na, pH 6,0. Les résultats de ces expériences (tableau 8) indiquent que le pH endosomal chez *Dictyostelium* est indépendant du pH du milieu d'incubation dans une gamme de pH de 5,1 à 7,0.

**Tableau 8. Influence du pH du milieu d'incubation sur le pH endosomal.**

pH du milieu d'incubation	pH endosomal
5,1	5,74 ± 0,04
5,6	5,78 ± 0,08
6,0	5,79 ± 0,05
6,5	5,85 ± 0,07
7,0	5,78 ± 0,10

Des amibes *Dictyostelium*,  $5 \times 10^6$  cellules/ml sont mises en incubation avec 2 mg/ml FITC-dextran en milieu AX2 pendant 3 heures. Le pH du milieu est ajusté dans une gamme de 5,1 à 7,0, et reste le même jusqu'à la fin de l'incubation. Les cellules sont remises en suspension dans du tampon 40 mM MES-Na, pH 6,0 et le pH endosomal est mesuré immédiatement à 22°C.

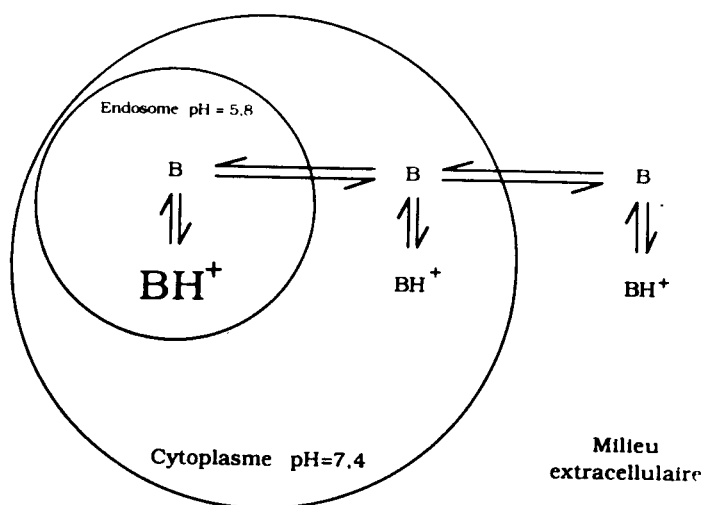
Pour étudier l'effet du pH du tampon de mesure sur le pH endosomal, les amibes chargées avec du FITC-dextran en milieu axénique (pH 6,5) sont remises en suspension dans des tampons à différents pH dans une gamme de pH de 5,1 à 7,0 (figure 27) et le pH endosomal est déterminé immédiatement. Le pH endosomal dépend légèrement du pH extérieur, en particulier du côté alcalin de la gamme. Afin de tester si cette légère dépendance du pH extérieur est dû à une exocytose du FITC-dextran pendant la mesure qui provoquerait une augmentation du signal de fluorescence, des expériences similaires ont été faites avec des tampons de mesure contenant 10 mM de caféine. Comme décrit précédemment, la caféine est un inhibiteur des voies d'endocytose chez *Dictyostelium* et elle empêche l'exocytose du FITC-dextran du compartiment endosomal (voir chapitre caféine). Les mesures de pH endosomal en présence de caféine montrent la même dépendance du pH externe de mesure, et excluent la possibilité d'un artefact lié à l'exocytose du marqueur de phase-fluide.



**Fig 27. Influence du pH externe de mesure sur le pH endosomal.** Le pH endosomal est mesuré sur des amibes ayant pinocyté du FITC-dextran (2mg/ml) pendant 3 heures en milieu axénique (pH 6,5). Les cellules sont remises en suspension dans des tampons à différents pH dans une gamme de 5,1 à 7,1. Les mesures dans la gamme de pH 5,1 à 6,5 sont réalisées avec du tampon 40 mM MES-Na; les mesures à pH 7,1 avec du tampon 40 mM Pipes.

#### **6.2.b Perturbation du pH endosomal par des bases faibles.**

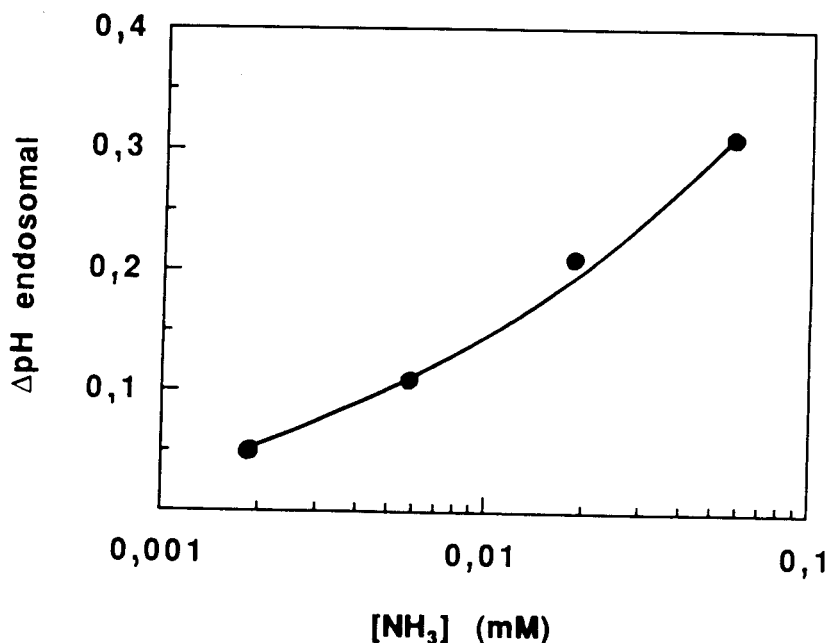
Les composés qui possèdent des propriétés de bases faibles s'accumulent dans les compartiments acides des cellules à la suite d'un processus de protonation (De Duve et al., 1974 ; Poole et Ohkuma, 1981; Maxfield, 1982). Les bases faibles sont des composés lipophiles dans leur forme non-protonée et peuvent ainsi traverser les membranes biologiques. Elles fixent un proton à l'intérieur des vésicules acides et deviennent hydrophiles dans leur forme protonée, et incapables de traverser les membranes de ces compartiments (figure 28). Une conséquence de leur accumulation est l'alcalinisation de la lumière vésiculaire. Un exemple bien connu de l'accumulation d'une base faible à l'intérieur des compartiments acides est celui de la chloroquine, un agent antimalarien qui entraîne l'alcalinisation des compartiments acides (entre pH 5,0 et 5,2) de différentes espèces de *Plasmodium*. Il a été suggéré que l'élévation du pH des compartiments acides chez *Plasmodium* empêche l'activité des protéases acides, responsables de la digestion d'hémoglobine (pour revue Ward, 1988).



**Fig 28. Mécanisme de capture de bases faibles à l'intérieur des compartiments acides.** La base dans sa forme non-protonée (B) diffuse librement à travers la membrane du compartiment acide. Une fois que la base est à l'intérieur de ce compartiment, elle est capturée par protonation, grâce au gradient de pH existant entre le compartiment acide et le cytosol. La base protonée (BH<sup>+</sup>) ne traverse pas la membrane du compartiment acide ou la traverse à une vitesse très faible par rapport à la base non-protonée.

L'alcalinisation du compartiment endosomal chez *Dictyostelium* est examinée par addition de NH<sub>4</sub>Cl (pK<sub>a</sub>= 9,25). Pour effectuer ces expériences, 10 mM NH<sub>4</sub>Cl est ajouté à des amibes ayant pinocyté le FITC-dextran et mises en suspension dans différents tampons dans une gamme de pH entre 6,0 et 7,5 et l'évolution du pH endosomal est suivie en fonction du temps. Le NH<sub>4</sub>Cl provoque une augmentation du pH endosomal qui atteint, en 2 minutes environ, une valeur d'équilibre plus alcaline que le pH de départ. L'alcalinisation du pH endosomal est tracée en fonction de la concentration de base non-protonée (NH<sub>3</sub>) (figure 29).

Une alcalinisation aussi efficace du compartiment endosomal est obtenue avec l'imidazole (pK<sub>a</sub>= 6,95). D'autres bases faibles qui alcalinisent le pH endosomal chez *Dictyostelium* de façon moins efficace sont la chloroquine (6 mM, pK<sub>a1</sub> = 8,1; pK<sub>a2</sub> = 10,2), la 4-diméthyl-aminopyridine (5 mM, pK<sub>a</sub>= 9,7), la N-éthylmorpholine (5mM, pK<sub>a</sub> = 8,4) et la triéthylamine (10 mM, pK<sub>a</sub>=10,7). Ces résultats, qui sont en accord avec les résultats de Cardelli et al. (1989) chez *Dictyostelium* (souche AX3), indiquent que 40 mM NH<sub>4</sub>Cl provoquent une augmentation du pH endosomal entre 0,4 et 0,7 en fonction du pH externe tandis que 3 mM chloroquine provoquent seulement une légère augmentation du pH endosomal.

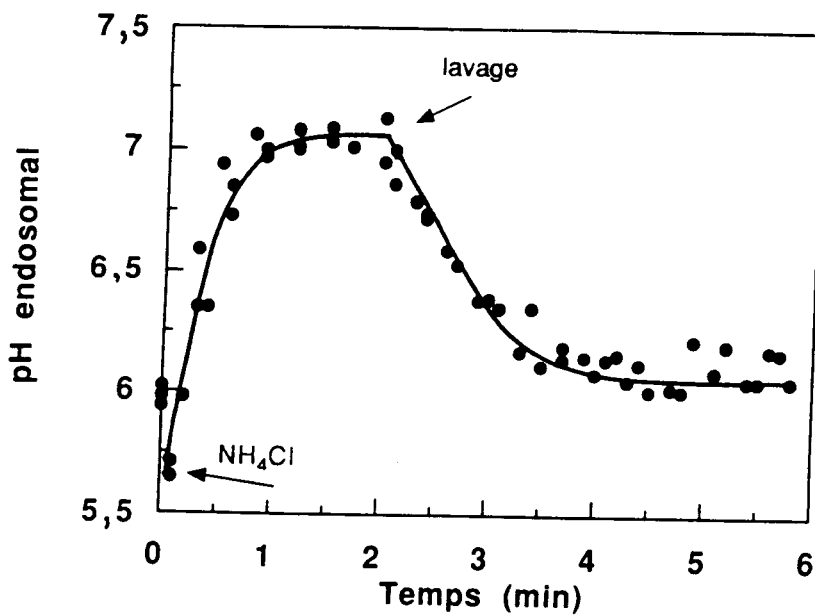


**Fig 29. Effet du  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sur le pH endosomal chez l'amibe *Dictyostelium*.** Des amibes ( $5 \times 10^6$  cellules/ml) ayant pinocyté du FITC-dextran (2 mg/ml), sont remises en suspension dans des tampons 50 mM NaPi à différents pH dans une gamme de 6,0 à 7,5, contenant 3 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . L'alcalinisation du pH endosomal est mesurée pendant 3 minutes. Le  $\Delta\text{pH}$  endosomal (la différence entre la valeur mesurée après 3min et la valeur de départ) est tracé en fonction du logarithme de la concentration de la base non-protonée ( $\text{NH}_3$ ).

Il n'y a pas de corrélation évidente entre le pKa de la base et son efficacité à augmenter le pH endosomal. Il faut également considérer d'autres facteurs, par exemple la lipophobicit  de la base (Cabantchik et al., 1989). En particulier, la chloroquine, une base faible qui est efficace pour alcaliniser le pH des compartiments acides dans d'autres cellules, est très ionisée à pH physiologique (< 0,01% sous la forme non-protonée). Il a été suggéré qu' il existe un mécanisme de transport de la forme protonée de cette base en parallèle avec des acides aminés basiques comme la lysine et l'arginine (Ferrari et Cutler, 1990).

L'alcalinisation produite par les bases faibles est un phénomène réversible que l'on met en évidence par élimination de la base du milieu extracellulaire (figure 30). Une fois que le pH endosomal de cellules traitées avec le  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (10 mM) atteint la valeur d'équilibre plus alcaline (pH  $\approx$  7,0), les cellules sont centrifugées et remises en suspension en absence de base. Dans ces conditions, le pH endosomal retourne régulièrement en 2 minutes environ à une valeur proche de celle de départ (pH 5,8).

Par ailleurs, afin de diminuer le gradient de pH entre l'endosome et le cytosol, l'acide propionique, un acide faible qui diminue le pH cytosolique (Inouye, K., 1988) et qui dirige la différenciation de *Dictyostelium* vers les pré-tiges (Gross et al., 1983), à une concentration de 10 mM n'entraîne aucune modification du pH endosomal.



**Fig 30. Réversibilité de l'alcalinisation du pH endosomal provoquée par le  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .** Ces expériences sont effectuées avec des cellules chargées avec du FITC-dextran et remises en suspension dans du tampon 25 mM NaPi, pH 7,5 contenant 10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . L'alcalinisation du pH endosomal est mesurée pendant 2 minutes. Après ce temps, les cellules sont récoltées par centrifugation (1 minute en Eppendorf), et remises en suspension dans du tampon 25 mM NaPi, pH 7,5 en absence de base faible.

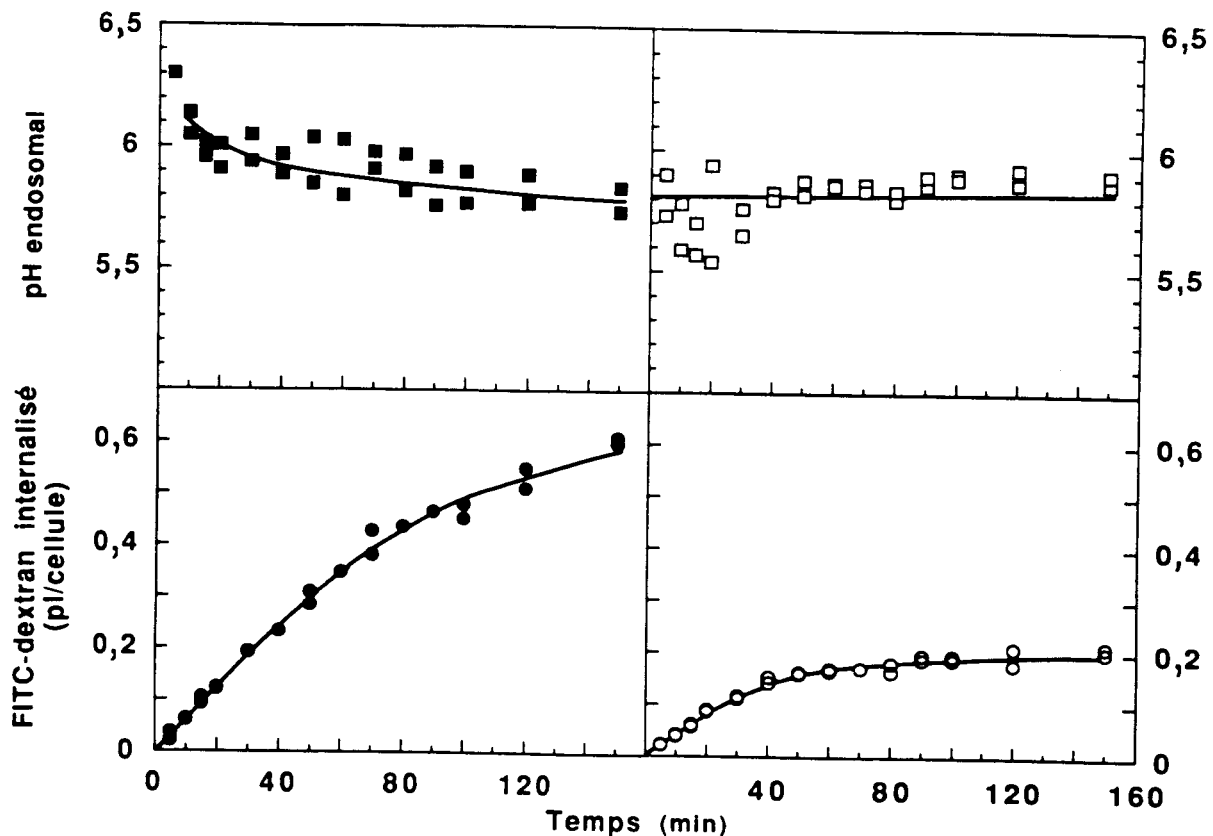
#### 6.2.c Effets d'autres agents : CCCP et monensine.

Avec l'intention de tester une diminution du niveau d'ATP dans la cellule, le CCCP, un découplant de la phosphorylation oxydative, a été ajouté à des cellules intactes dans des conditions où il empêche toute synthèse d'ATP chez *Dictyostelium* (Satre et al., 1986). Le CCCP à une concentration de l'ordre de  $10^{-4}$  M, augmente de 0,7 unité le pH endosomal dans des cellules mises en suspension dans un tampon à pH 6,5 après une période d'environ 5 minutes.

D'autres agents capables d'augmenter le pH endosomal par un mécanisme différent de celui des bases faibles annulent l'acidité du compartiment endosomal. Des cellules mises en suspension à pH 5,5 avec la monensine, un ionophore échangeant un  $\text{H}^+$  contre un ion monovalent ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ; Marnell et al., 1982 ; Ledger et Tazer, 1984), augmente le pH endosomal à une concentration de  $5 \times 10^{-5}$  M. L'augmentation du pH endosomal s'effectue graduellement pendant une période de 3 minutes.

### 6.3 Le pH endosomal lors des cinétiques de pinocytose de phase-fluide.

La voie endocyttaire chez les eucaryotes supérieurs est constituée d'une population hétérogène des compartiments endosomaux, précoces et tardifs qui se différencient par leur fonction et par leur pH (pour revue Yamashiro et Maxfield, 1988). Pour restreindre la localisation d'un marqueur de phase-fluide aux compartiments précoces de l'endocytose, des périodes d'incubations courtes sont réalisées en présence des marqueurs.



**Fig 31. pH endosomal lors de cinétiques de pinocytose de phase-fluide.**

Des amibes,  $5 \times 10^6$  cellules/ml, sont mises en pré-incubation en milieu axénique ou en tampon MES-Na, pH 6,5 à 22°C en agitation continue (170 rpm) pendant 15 minutes. La cinétique est commencée par l'addition de FITC-dextran à une concentration finale de 6 mg/ml. L'internalisation du FITC-dextran, en milieu axénique (●) ou en tampon MES-Na (○), est suivie en faisant des prélèvements de la suspension cellulaire en fonction du temps. Le pH endosomal est mesuré immédiatement après la remise en suspension des cellules à  $5 \times 10^6$  cellules/ml, dans du tampon 40 mM MES-Na de pH 6,0 à 22°C. pH endosomal lors de la pinocytose en milieu axénique (■) ou en tampon MES-Na (□).



Afin d'explorer et de mettre en évidence une éventuelle hétérogénéité d'endosomes chez l'amibe *Dictyostelium*, l'approche suivie est la détermination du pH sondé par le FITC-dextran lors de l'occupation progressive des compartiments endosomaux. Une approche similaire a été suivie chez *Entamoeba histolytica* pour étudier les compartiments intracellulaires acides (Löhdén-Bendinger et Bakker-Grunwald, 1990). Chez *Dictyostelium*, l'évolution du pH endosomal est déterminée pendant les cinétiques de pinocytose de FITC-dextran soit en milieu axénique, soit en milieu non-nutritif. Pendant les premières 15-20 minutes de l'internalisation du marqueur de phase-fluide, la précision des mesures ne permet pas d'analyser les éventuelles variations de pH endosomal. A ce niveau, environ 20 % du compartiment endosomal est rempli et le signal de fluorescence des cellules mises en incubation sans FITC-dextran (signal qu'il faut soustraire), représente plus de 60 % du signal de fluorescence des cellules qui internalisent le FITC-dextran. Pour des niveaux d'internalisation supérieurs à 20 %, le pH endosomal est maintenu à 5,8 dans les deux milieux de charge (figure 31), résultat suggérant un compartiment homogène en pH.

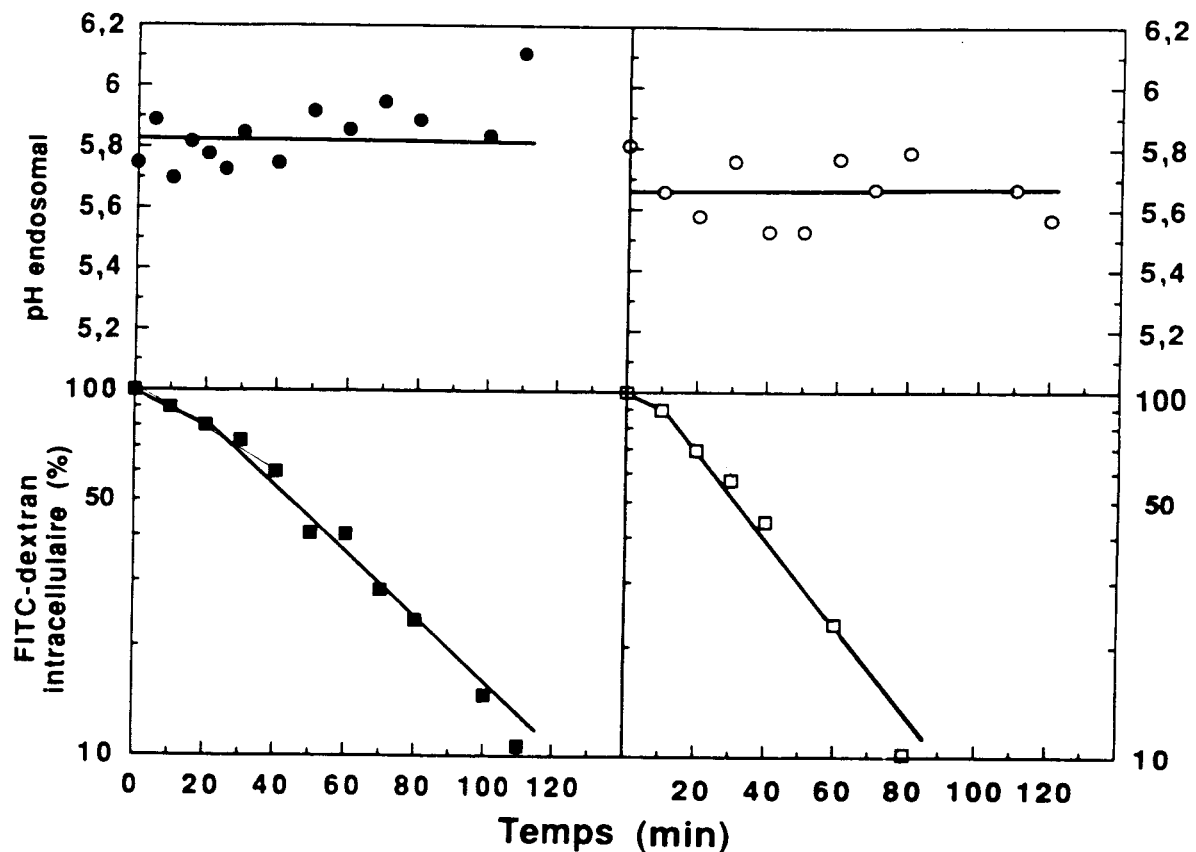
#### **6.4 Le pH endosomal lors de cinétiques d'exocytose de FITC-dextran.**

Une deuxième approche pour explorer les compartiments acides chez *Dictyostelium* consiste à déterminer le pH endosomal lors de cinétiques d'exocytose du marqueur de phase-fluide dans des cellules préalablement chargées avec le marqueur fluorescent.

Durant la cinétique d'exocytose du FITC-dextran soit en milieu axénique soit en tampon MES-Na (pH 6,5), le pH sondé par le FITC-dextran reste constant à 5,7- 5,8 (figure 32) jusqu'à des niveaux où le volume occupé par le marqueur de phase-fluide représente environ 20 % du compartiment endosomal. Ce résultat indique un pH homogène dans les compartiments du début de la voie endocytaire et les compartiments terminaux. Le pH endosomal mesuré dans les derniers temps de l'exocytose est sujet à la même imprécision que les mesures du début des cinétiques de pinocytose de phase-fluide.

Classiquement, les lysosomes sont marqués par des sondes fluorescentes pendant des périodes de temps prolongés (par exemple, pendant 12 heures avec le FITC-dextran, Ohkuma, 1989) suivies des périodes de chasse (entre 1 et 2 heures) dans un milieu en absence de marqueur fluorescent (Swanson, 1989). La chasse permet d'éliminer le

marqueur fluorescent des compartiments précoces de la voie endocyttaire tels que les endosomes et de le restreindre aux lysosomes. Afin de marquer les lysosomes, des amibes *Dictyostelium* ont été mises en incubation avec le FITC-dextran en milieu axénique de croissance pendant des temps entre 5 et 14 heures. Les cinétiques d'exocytose de FITC-dextran ne sont pas modifiées par le temps de charge et, dans tous les cas, le pH mesuré reste constant autour de 5,8 pendant l'exocytose.



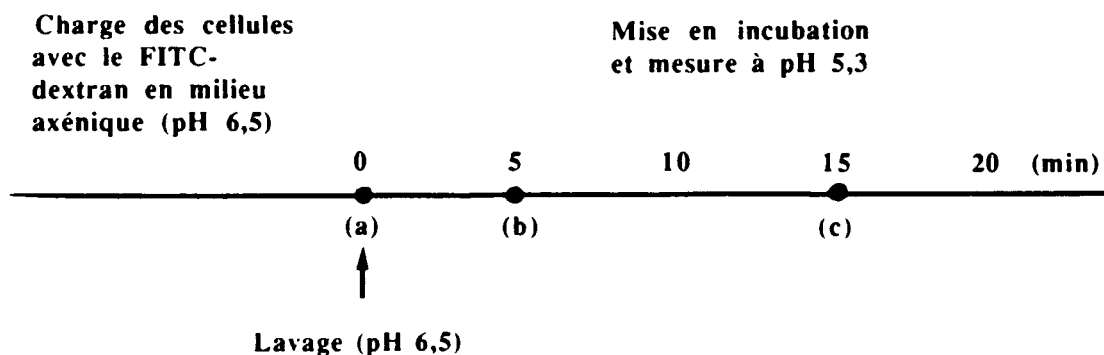
**Fig 32. Mesure du pH endosomal lors de cinétiques d'exocytose de FITC-dextran.** Ces expériences sont effectuées avec des amibes préalablement chargées pendant 180 minutes avec 2 mg/ml FITC-dextran comme décrit dans le chapitre matériel et méthodes, soit en milieu axénique, soit en 40 mM MES-Na, pH 6,5. Les cellules sont remises en suspension sans FITC-dextran, en milieu axénique (■) ou en tampon 40 mM MES-Na, pH 6,5 (○) selon les conditions d'internalisation du FITC-dextran. L'exocytose du marqueur de phase-fluide est suivie en faisant des prélèvements de la suspension cellulaire en fonction du temps. Le pH endosomal est mesuré immédiatement après la remise en suspension de cellules à  $5 \times 10^6$  cellules/ml dans du tampon 40 mM MES-Na, pH 6,0 à 22°C. pH endosomal lors de l'exocytose en milieu axénique (●) ou en tampon MES-Na (□).

### **6.5 Evolution du pH endosomal lors des étapes précoces de l'endocytose.**

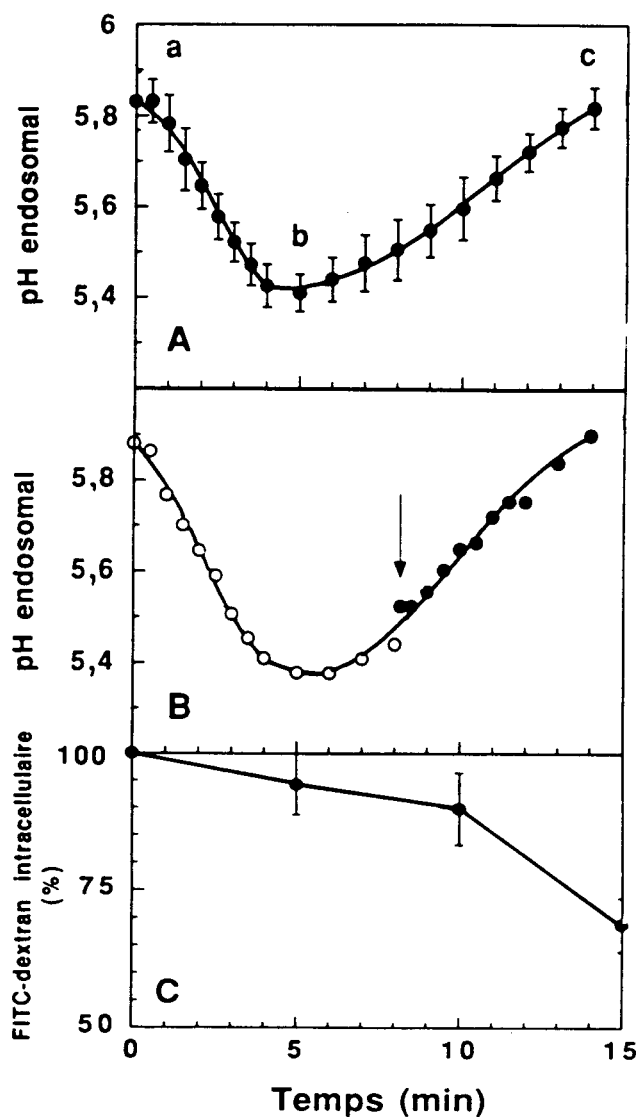
Une mesure directe du pH endosomal dans les étapes précoces de la pinocytose (< 15 minutes) est techniquement difficile lors des cinétiques de pinocytose de FITC-dextran, à cause du faible niveau d'internalisation du FITC-dextran. Une troisième approche pour augmenter la résolution de la mesure du pH endosomal pendant les étapes précoces de la pinocytose est la détermination du pH endosomal sur des périodes de 15-20 minutes après la remise en suspension des cellules préalablement chargées avec le FITC-dextran. Dans ces conditions, le signal initial de fluorescence est élevé et permet de détecter d'éventuelles variations avec une bonne précision.

Pour effectuer ces expériences, des amibes *Dictyostelium* ayant internalisé le FITC-dextran en milieu axénique, sont remises en suspension à pH 5,3 à 22°C et le pH endosomal est mesuré pendant 15-20 minutes (schéma 1). On observe que le pH endosomal évolue de façon spontanée avec une cinétique biphasique qui est caractérisée par trois états : "a", "b", "c" (figure 33-A). Le pH mesuré au départ de la cinétique est 5,8 (état a). La première phase qui dure environ 5 minutes, est une acidification régulière où le pH endosomal diminue jusqu'à un minimum à environ pH 5,1- 5,4 (état b). La deuxième phase est une augmentation régulière du pH endosomal qui atteint une valeur constante de 5,8-6,0 après 15-20 minutes (état c). L'étape d'acidification de cette cinétique n'est pas une conséquence directe de l'exocytose du marqueur de phase-fluide lors de la mesure, car après 5 minutes d'évolution (état b), l'exocytose du FITC-dextran est seulement de 5 % (figure 33-C). A pH 5,3, le FITC-dextran est peu fluorescent.

**Schéma 1**



Afin d'examiner si l'évolution spontanée du pH endosomal n'est pas une conséquence du lavage à froid lors de l'élimination du marqueur de phase fluide non-intériorisé, la continuité de l'évolution a été testée après un lavage à froid dans une étape intermédiaire de la cinétique. Les cellules ayant pinocyté le FITC-dextran sont remises en suspension à pH 5,3 à 22°C. Après 8 minutes d'évolution, quand le pH endosomal aborde la phase d'augmentation, les cellules sont récoltées et lavées à froid (0-4°C), puis remises en suspension à pH 5,3 à 22°C. Après ce traitement, on observe une continuité de la cinétique d'évolution du pH endosomal (figure 33-B). Dans une expérience similaire où les cellules sont récoltées après au moins 15 minutes d'évolution (état c) puis lavées à 0-4°C et remises en suspension à 22°C à pH 5,3, on n'observe aucune évolution et le pH endosomal reste constant à pH 5,8.



**Fig 33. Evolution du pH endosomal lors des phases initiales de l'exocytose.**

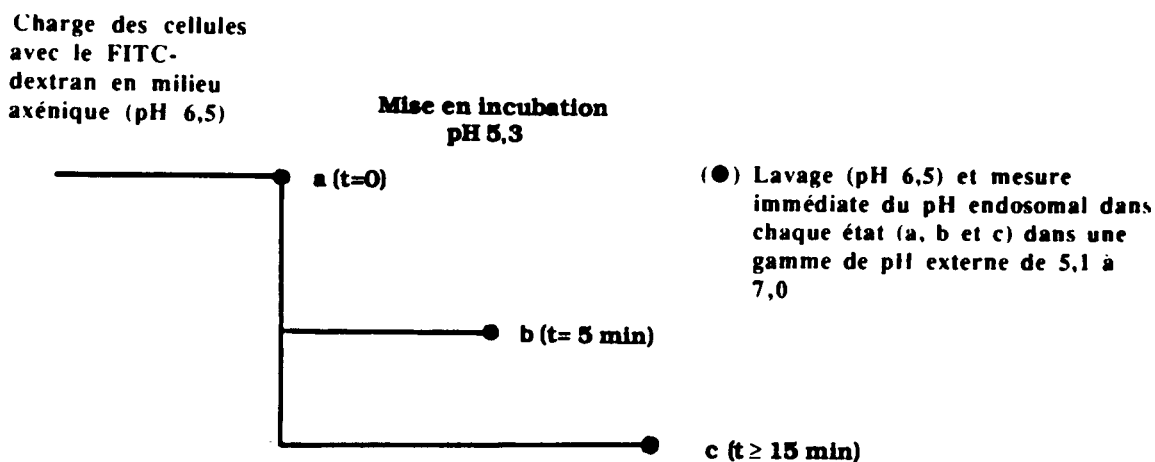
A) L'évolution du pH endosomal est mesurée à 22°C dans une cuve de fluorescence avec des amibes ayant pinocyté le FITC-dextran et remises en suspension à  $5 \times 10^6$  cellules/ml dans du tampon 40 mM MES-Na, pH 5,3.

B) Continuité de l'évolution du pH endosomal. L'évolution du pH endosomal est mesurée pendant 8 minutes (○) comme décrit dans la partie "A" de la figure. Après huit minutes de mesure, les cellules sont récoltées à partir de la cuve de fluorescence (indiqué par la flèche), puis lavées deux fois à 0-4 °C par du tampon MES-BSA, pH 6,5 et remises en suspension à 22°C dans du tampon 40 mM MES-Na, pH 5,3 (●).

C) Exocytose de FITC-dextran pendant l'évolution du pH endosomal.

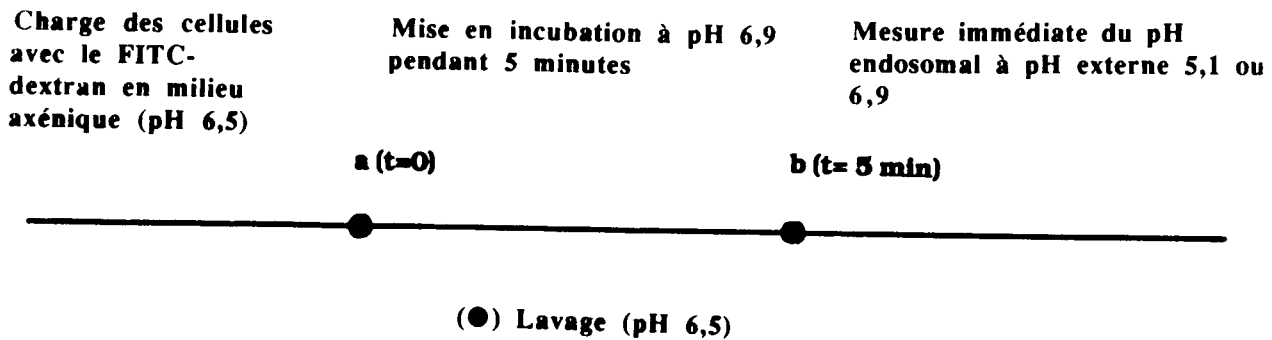
L'influence du pH externe lors de la mesure du pH endosomal a été examinée sur chacun des trois états (a, b et c) de l'évolution biphasique du pH endosomal. Des amibes ayant internalisé le FITC-dextran en milieu axénique sont amenées dans l'un des trois états (a, b, c) par incubation à pH 5,3 dans une cuve de fluorescence à 22°C pendant 0, 6 ou des temps supérieurs à 15 minutes. Dans chaque état, le marqueur de phase-fluide extracellulaire est éliminé par centrifugation et les culots de cellules sont remis en suspension dans des tampons à différents pH, dans la gamme de 5,1 à 7,0, et le pH endosomal est mesuré immédiatement (schéma 2). Le pH endosomal mesuré soit dans l'état "a" (pH 5,8), "b" (pH 5,4) ou "c" (pH 5,8-6,0) est toujours indépendant du pH du milieu externe. L'influence du pH externe sur le pH endosomal mesuré immédiatement après la charge des cellules avec le FITC-dextran et la remise en suspension à différents pH (état a) a déjà été démontrée dans la partie 6.2 de ce chapitre.

Schéma 2



L'influence du pH du milieu utilisé lors du suivi de l'exocytose du FITC-dextran a été examinée en resuspendant les cellules à pH 6,9. Après 5 minutes d'incubation, les amibes sont lavées à froid et remises en suspension dans un tampon 40 mM MES-Na, pH 5,1 ou 6,9. Le pH endosomal mesuré dans les deux cas est égal à pH 5,1-5,4.

### Schéma 3



#### 6.6 Effets de la caféine et de la bafilomycine, sur l'évolution du pH endosomal.

La caféine inhibe de façon immédiate l'endocytose chez *Dictyostelium*. Afin de saisir une éventuelle étape du trafic vésiculaire sensible à la caféine, la cinétique d'évolution du pH endosomal a été testée en présence de 10 mM caféine. Cet inhibiteur efface la cinétique biphasique lors de l'évolution du pH endosomal. Dans ces conditions, le pH endosomal reste constant à 5,8 pendant au moins 15 minutes. Si l'inhibiteur est ajouté dans une étape intermédiaire de l'évolution, par exemple après 3 minutes, le pH endosomal remonte rapidement à la valeur de départ (pH 5,8) de la cinétique d'évolution (figure 34).

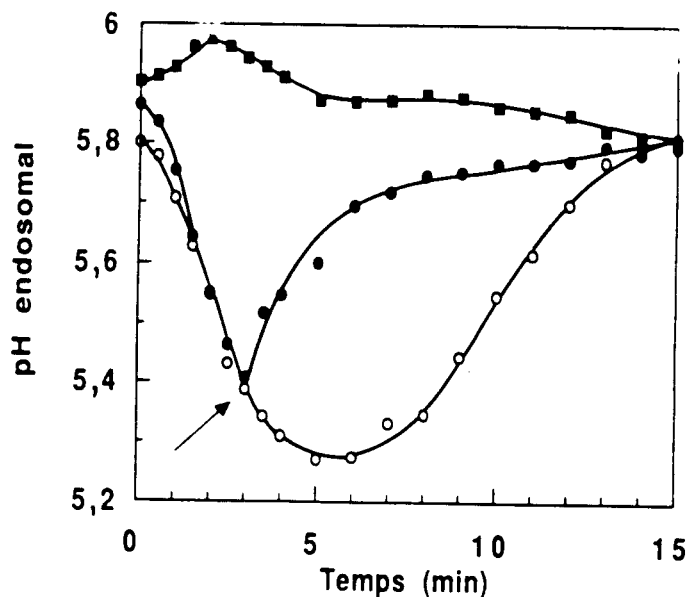
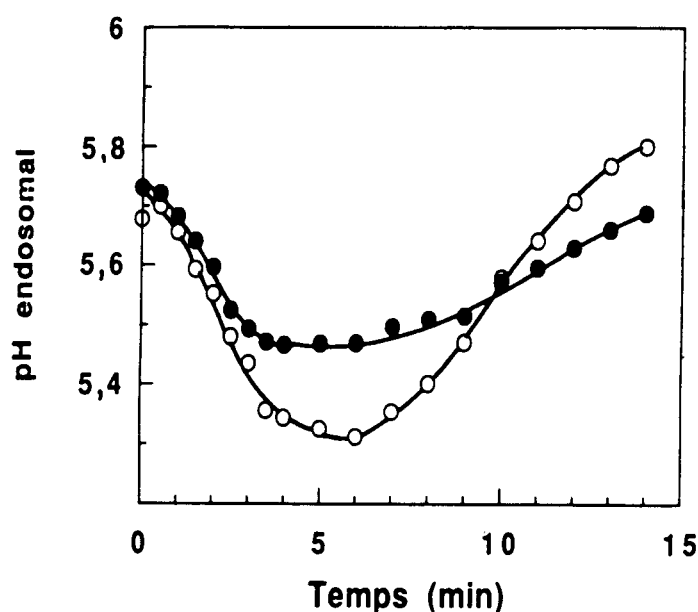


Fig 34. Effet de la caféine sur l'évolution du pH endosomal lors des phases initiales de l'exocytose. Des amibes chargées avec du FITC-dextran sont remises en suspension: (○) dans du tampon 40 mM MES-Na, pH 5,3; (■) dans le même tampon contenant 10 mM caféine; (●) dans du tampon 40 mM MES-Na pH 5,3 plus 10 mM caféine ajoutés après 3 minutes d'évolution (indiqué par la flèche).

Afin d'évaluer un rôle éventuel d'une H<sup>+</sup>ATPase vacuolaire dans l'évolution du pH endosomal, la bafilomycine, un inhibiteur spécifique des ATPases vacuolaires (Bowman et al., 1988), a été testée à une concentration 25  $\mu$ M. La bafilomycine réduit légèrement la phase d'acidification de la cinétique d'évolution du pH endosomal (figure 35), dont l'effet pourrait être dû à une faible perméabilité de l'inhibiteur dans la cellule.



**Fig 35. Effet de la bafilomycine sur l'évolution du pH endosomal lors des phases initiales de l'exocytose.** Des amibes ayant pinocyté le FITC-dextran sont remises en suspension: (○) dans du tampon 40 mM MES-Na, pH 5,3; (●) dans le même tampon contenant 25  $\mu$ M bafilomycine.

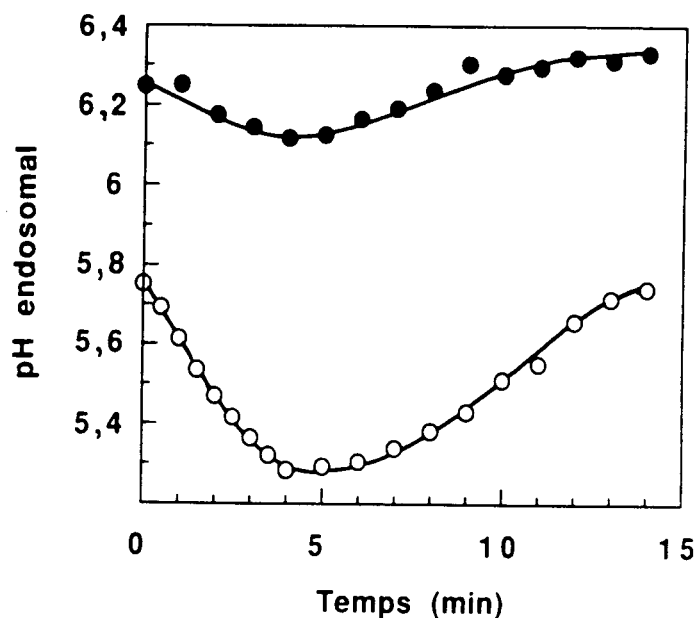
### 6.7 Le pH endosomal dans des mutants de l'endocytose.

Une approche génétique pour étudier l'endocytose est l'utilisation de mutants affectés d'une manière sélective dans les voies d'endocytose. Cette stratégie a été employée avec succès pour l'isolement de mutants déficients de l'endocytose à récepteurs dans divers types d'eucaryotes supérieurs (Krieger et al., 1985), ainsi que pour l'isolement de mutants déficients de l'acidification, par exemple dans les cellules CHO (Merion et al., 1983 ; Yamashiro et Maxfield, 1987 ; Colbaugh et al., 1989) et chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Rothman et al., 1989). Dans cette optique, des mutants de l'endocytose ont été isolés au laboratoire.

Une collection de 15 mutants de *Dictyostelium* résistants au méthylène diphosphonate (MDP) a été isolée. Le MDP est une drogue qui pénètre par pinocytose de phase-fluide et inhibe la croissance axénique par la production d'analogues de l'adénosine triphosphate et de la diadénosine tétraphosphate (Klein et al., 1988). Trois mutants

résistants au MDP (HGR5, HGR8 et HGR9) ont été caractérisés récemment et présentent une pinocytose de phase-fluide réduite à plus de 50 %, leur contenu en enzymes lysosomales est aussi diminué mais en gardant une vitesse de sécrétion élevée (Bof et al., sous presse). Les mutants résistants au MDP ont un phénotype similaire à celui de la souche mutante de *Dictyostelium* HMW570 (Cardelli et al., 1990 ; Ebert et al., 1990) qui présente une forte activité de sécrétion des enzymes lysosomales pendant la croissance axénique et une pinocytose de phase-fluide diminuée.

Les mesures de pH endosomal au plateau de la pinocytose avec le FITC-dextran dans les trois mutants résistants au MDP mettent en évidence un défaut de l'acidification. Dans une série d'expériences ( $n \geq 6$ ,  $\pm$  S.E.), le pH endosomal est  $6,08 \pm 0,24$  pour HGR5,  $6,10 \pm 0,17$  pour HGR8 et  $5,99 \pm 0,10$  pour HGR9, valeurs légèrement augmentées par rapport à celle de la souche parentale AX2 (pH  $5,8 \pm 0,2$ ). D'autres expériences réalisées au laboratoire qui soutiennent l'idée d'un défaut de l'acidification consistent en une accumulation d'acridine orange diminuée dans la fraction qui correspond aux acidosomes (Padh et al., 1991). Un compartiment à pH 4,3 détecté par RMN du  $^{31}\text{P}$  dans la souche AX2 est absent dans les trois mutants résistants au MDP. Des expériences de mesure du pH endosomal avec le mutant HGR5 indiquent une très forte diminution de l'évolution vers les pH acides (figure 36).



**Fig 36. Evolution du pH endosomal lors des phases initiales de l'exocytose chez le mutant HGR5.** Des amibes du mutant HGR5 sont remises en suspension dans du tampon 40 mM MES-Na, pH 5,3 (●). Evolution du pH endosomal de la souche AX2 dans les mêmes conditions (○).



## **6.8 Le pH endosomal lors de la différenciation cellulaire.**

Lors du programme de différenciation cellulaire de *Dictyostelium*, le pH intracellulaire des cellules joue un rôle clé, en orientant les cellules soit vers la formation de spores soit vers la formation de tiges. D'une part, un ensemble d'expériences indirectes mettent en évidence la relation étroite entre le pH intracellulaire et le développement chez *Dictyostelium*; par exemple une augmentation du pH intracellulaire, provoquée par l'addition de bases faibles, inhibe la formation de tiges et favorise la formation de spores tandis qu'une diminution du pH intracellulaire, provoquée par l'addition d'acides faibles, entraîne l'effet opposé (Gross et al. 1983 ; Inouye, 1989). D'autre part, la relation probable entre le pH endosomal et le programme de différenciation cellulaire est un aspect qui n'a pas encore été étudié.

Dans une expérience lors de l'engagement du programme de différenciation cellulaire de *Dictyostelium* le pH endosomal, la pinocytose de phase-fluide et la taille cellulaire ont été examinés. Pour enclencher la différenciation cellulaire, les amibes sont soumises à une carence nutritive par incubation dans un milieu non-nutritif contenant le FITC-dextran. Pendant une période de 20 heures, le pH endosomal, la pinocytose de phase-fluide et le volume cellulaire sont mesurés (figure 37).

Aucune variation significative du pH endosomal n'est observée pendant les 20 heures de jeûne en restant constant à pH 5,8. Cette valeur pourrait correspondre au pH endosomal de vésicules de densité légère identifiées pendant la différenciation cellulaire de *Dictyostelium*. Deux types de vésicules ont été identifiées (Lenhard et al., 1989), une population de densité légère ( $\rho = 1,07 \text{ g/ml}$ ) qui contient de la phosphatase acide et la tréhalase, présente dans la phase végétative et conservée lors de la différenciation cellulaire. Une deuxième population de vésicules lourdes ( $\rho = 1,13 \text{ g/ml}$ ) qui apparaît durant l'étape d'agrégation et qui ne contient pas de tréhalase ni la forme tardive de la phosphatase acide (forme qui caractérise la phase végétative de *Dictyostelium*).

Le volume de FITC-dextran internalisé au plateau de la pinocytose est de 0,25 pl/cellule, et se maintient pendant les premières 8 heures de la différenciation. Dans les 6 heures suivantes, on observe une diminution graduelle du volume du marqueur pinocyté. Après 15 heures de différenciation, la diminution du marqueur de phase-fluide pinocyté est de 50% et se maintient constante jusqu'à la fin de l'expérience.

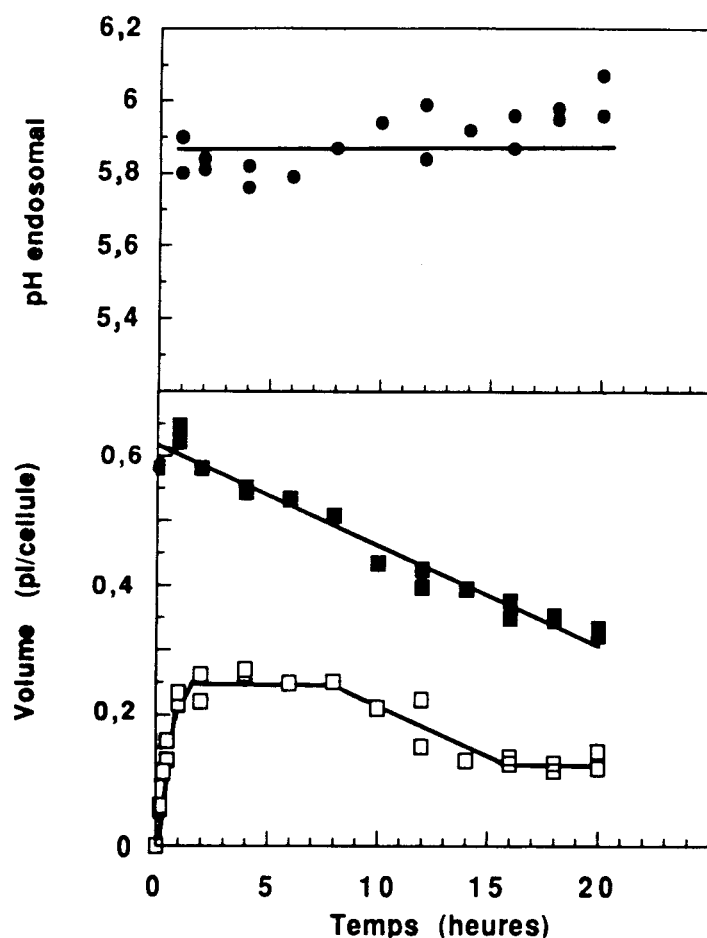


Fig. 37. Mesure du pH endosomal et de la pinocytose de phase-fluide lors de la différenciation cellulaire. Des amibes *Dictyostelium*,  $1 \times 10^7$  cellules/ml sont mises à jeûner dans du tampon 40 mM MES-Na, pH 6,5 en présence de 6 mg/ml FITC-dextran, en agitation rotative (170 rpm) à 22°C. Le pH endosomal (●), le volume de FITC-dextran internalisé (□) et la taille cellulaire (■) sont déterminés en fonction du temps.

Maeda (1983) a signalé que l'activité endocytaire chez *Dictyostelium* diminue au cours de la différenciation cellulaire. Afin de quantifier cette diminution, des amibes ont été mises en jeûne dans un tampon 40 mM MES-Na, pH 6,5, pendant une période de 15 heures. Des cinétiques d'internalisation du FITC-dextran ont été réalisées en fonction du temps de jeûne et le volume du marqueur internalisé au plateau de chaque cinétique a été mesuré. Pendant les premières 6 heures de jeûne les cellules internalisent environ 0,3 pl de FITC-dextran/cellule. Après 8 heures de jeûne, le volume du marqueur pinocyté diminue de 40 % et décroît régulièrement au cours du temps. Après 12 heures de jeûne, le volume pinocyté représente moins de 5 %. Dans tous les cas, le pH endosomal reste constant à pH 5,8. La diminution de l'activité endocytaire observée au cours de la différenciation est indépendante du pH externe dans une gamme de 5,7 à 7,0.

Pendant la période de carence nutritive, on observe une diminution du volume cellulaire. Au temps zéro, le volume cellulaire est 0,57 pl et diminue de façon linéaire avec une vitesse d'environ 0,015 pl/heure. La diminution de l'activité de pinocytose et du volume cellulaire fait que ceux-ci pourraient servir d'indicateurs de l'engagement de la différenciation cellulaire chez *Dictyostelium*.

## 6.9 Discussion

Au plateau de la pinocytose, le FITC-dextran sonde un compartiment majeur à pH  $5,8 \pm 0,2$  qui est indépendant du pH externe et alcalinisé par des bases faibles et d'autres agents comme le CCCP et la monensine. Cette valeur est à comparer à celle trouvée par Cardelli et al. (1989) pour le pH endosomal (pH 5,4) dans la souche AX3. Pendant les cinétiques de pinocytose et d'exocytose de FITC-dextran, le pH endosomal reste constant à 5,8. Une étape précoce de l'endocytose a été identifiée où participerait un compartiment à  $\text{pH} \leq 5,4$  en équilibre avec le milieu extracellulaire. L'étape précoce est fortement diminuée chez le mutant HGR5, qui est déficient de l'acidification. Lors du programme de différenciation cellulaire, le compartiment majeur à pH 5,8 reste constant.

L'amibe *Dictyostelium* possède un compartiment acide majeur, homogène en pH.

Les mesures de pH lors des cinétiques de pinocytose de phase-fluide (>15 minutes), suggèrent l'existence d'un compartiment endosomal majeur, homogène en pH chez l'amibe *Dictyostelium*. Le pH endosomal reste constant tout au long du remplissage progressif du compartiment endosomal par le FITC-dextran. La détermination des compartiments acides précoces lors des cinétiques de pinocytose est techniquement difficile, à cause du faible niveau d'internalisation de FITC-dextran dans ces conditions.

Lors des cinétiques d'exocytose de FITC-dextran, après une phase initiale de 15 minutes, le pH endosomal reste constant pendant toute l'exocytose du marqueur de phase-fluide. Le pH endosomal mesuré au cours de l'exocytose est indépendant du temps de charge avec le FITC-dextran. Ces expériences suggèrent aussi l'idée d'un compartiment endosomal homogène en pH ou bien l'existence d'une seule étape cinétique limitant l'exocytose.

L'amibe *Dictyostelium* possède aussi un compartiment acide précoce .

Pendant les étapes initiales de l'exocytose, dans les premières minutes qui suivent la remise en suspension des cellules ayant pinocyté le FITC-dextran, s'observe une cinétique biphasique d'évolution du pH endosomal. Cette cinétique s'explique par une internalisation de fluide dans un compartiment précoce à  $\text{pH} \leq 5,4$ , suivie d'un transfert rapide vers le compartiment majeur à  $\text{pH} 5,8-6,0$  qui correspond au compartiment sondé lors des cinétiques de pinocytose et d'exocytose de FITC-dextran. Ces expériences mettent en évidence l'existence d'une population de vésicules hétérogènes en pH, sondées par le FITC-dextran.

L'hypothèse d'un compartiment acide précoce est appuyée par plusieurs expériences : la continuité de la cinétique de l'évolution du pH endosomal après des lavages à froid dans des étapes intermédiaires de la cinétique ; le fait que cette évolution est abolie par la caféine (un inhibiteur de l'endocytose chez *Dictyostelium*.); ainsi que par la forte diminution de l'évolution du pH endosomal chez le mutant HGR5, déficient de l'acidification.

L'effet de la caféine sur la cinétique biphasique d'évolution du pH endosomal peut s'expliquer par une augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique. La caféine est un agent qui relâche le  $\text{Ca}^{2+}$  des réservoirs intracellulaires. Afin de rétablir l'homéostasie, le  $\text{Ca}^{2+}$  serait capturé à l'intérieur des vésicules d'endocytose par un mécanisme qui éjecterait au même temps des protons à partir des vésicules d'endocytose; ainsi les vésicules d'endocytose jouent le rôle de tampon qui régule la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique dans un délai bref. Un mécanisme de régulation du calcium dans les vésicules d'endocytose a été rapporté chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Ohsumi et Anraku, 1983). Dans ce système, l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  à l'intérieur de vésicules d'endocytose est dépendante d'ATP et couplée à un échange  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ . Un mécanisme de régulation similaire a été suggéré chez *Neurospora crassa* (Miller et al., 1990). Chez *Dictyostelium*, une pompe à  $\text{Ca}^{2+}$  associée aux endosomes a été identifiée (Milne et Coukell, 1989). Cette pompe a une haute affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_m = 0,3 \mu\text{M}$ ) et est inhibée par des concentrations micromolaires de  $\text{La}^{3+}$ , cependant aucun cotransport de protons n'a été mis en évidence.

Le pH du compartiment acide majeur est augmenté chez les mutants de *Dictyostelium* résistants au MDP (HGR5, HGR8 et HGR9). En particulier, chez le mutant

HGR5, la cinétique biphasique qui caractérise l'étape précoce de l'endocytose est fortement diminuée. Les événements de l'acidification, probablement affectés chez les mutants MDP, sont l'activité de l'H<sup>+</sup>ATPase responsable de l'acidification des compartiments endocytaires ou bien l'association des vésicules d'endocytose avec les endosomes (Padh et al. , 1991 a,b).

Enfin, le pH du compartiment acide majeur reste constant au cours de la différenciation chez *Dictyostelium*, et ainsi ne constituerait pas un signal qui déclencherait ou qui orienterait ce processus.

# CONCLUSION

## CONCLUSION

*Dictyostelium* s'avère un organisme bien adapté pour l'étude de l'endocytose. Le mécanisme de l'endocytose peut être étudié à trois niveaux. Un premier niveau qui est fondamental est l'étude de l'endocytose comme un processus global de la cellule. Le deuxième niveau est l'identification et la caractérisation des facteurs qui interviennent dans l'endocytose, par exemple les différentes protéines et facteurs cytosoliques. Le troisième niveau est la connaissance du mécanisme biochimique, c'est à dire l'étude des interactions des différents facteurs impliqués dans l'endocytose. Le but de mon travail a été l'étude de l'endocytose comme un processus global par la caractérisation d'inhibiteurs de l'endocytose ainsi que par l'exploration des compartiments acides.

La pinocytose de phase-fluide joue un rôle essentiel dans la nutrition de l'amibe *Dictyostelium*. Le FITC-dextran, un marqueur de phase-fluide est internalisé selon une cinétique biphasique, dont la première étape est linéaire suivie d'un plateau qui reste constant pendant plusieurs heures. La pinocytose de phase-fluide est plus active en milieu nutritif et probablement liée à la participation d'un composant de l'endocytose à récepteurs.

Les cinétiques de pinocytose de phase-fluide ont été traitées selon un modèle à un compartiment endosomal. L'idée d'un compartiment unique est appuyée par l'effet de la température sur l'internalisation de FITC-dextran. L'activité pinocytaire diminue avec une baisse de la température sans aucune discontinuité dans la gamme de température entre 22 et 5°C. Les cinétiques d'exocytose de FITC-dextran montrent, après une phase de latence de quelques minutes, une cinétique de pseudo-premier ordre, ce qui suggère la sortie du marqueur d'un seul compartiment endosomal ou bien suggère l'existence d'une étape cinétique limitante.

Deux nouveaux inhibiteurs de l'endocytose chez *Dictyostelium* ont été caractérisés, la caféine et la cycloheximide qui sont très efficaces pour inhiber les voies d'entrée et de sortie du trafic vésiculaire : la pinocytose de phase-fluide, la phagocytose et la sécrétion des enzymes lysosomales. L'hypothèse postulée pour expliquer l'effet inhibiteur de la caféine sur l'endocytose est une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique ; une expérience qui soutient cette hypothèse est l'inhibition de la pinocytose de phase-fluide par le cation  $\text{La}^{3+}$ , un inhibiteur du transport de  $\text{Ca}^{2+}$ . Quant à la cycloheximide, une hypothèse qui semble probable pour expliquer l'effet inhibiteur, est un mécanisme régulateur par exemple lié à un changement de l'état de phosphorylation des protéines.

Le FITC-dextran utilisé comme sonde de pH montre que le matériel internalisé par endocytose est transporté par l'intermédiaire de vésicules acides. Dans le but d'identifier les différents compartiments acides, j'ai réalisé un ensemble de déterminations de pH endosomal avec le FITC-dextran qui sont interprétées selon un modèle de trafic vésiculaire où le fluide est d'abord internalisé à travers une zone précoce d'internalisation qui implique un compartiment à pH 5,4 en équilibre avec l'extérieur où s'effectuerait un échange lent de fluide avec le milieu extracellulaire. Au delà de l'étape précoce de l'endocytose qui dure environ 5 minutes, le FITC-dextran sonde un compartiment majeur à pH 5,8.

L'éventuel compartiment à  $\text{pH} \leq 5,4$  détecté par le FITC-dextran lors des phases initiales de l'exocytose pourrait correspondre à un compartiment très acide (pH 4,3) détecté par RMN du  $^{31}\text{P}$ . Une explication pour la différence de pH mesuré par les deux techniques est que lors de mesures de pH par la fluorescence du FITC-dextran, le pH réel du compartiment très acide n'est pas observable expérimentalement en raison de sa très faible intensité de fluorescence par rapport à celle du compartiment majeur à pH 5,8.

Des mutants de l'endocytose, résistants au MDP, ont été isolés au laboratoire. Trois mutants ont été caractérisés (HGR5, HGR8 et HGR9) et présentent un défaut de l'acidification des compartiments sondés par le FITC-dextran. Des expériences de mesure du pH endosomal avec le mutant HGR5 indiquent une très forte diminution de l'étape précoce d'acidification.

En ce qui concerne le mécanisme d'acidification des compartiments intracellulaires chez *Dictyostelium*, Padh et al. (1989a, 1989b, 1991a, 1991b) ont apporté des évidences que les endosomes qui viennent d'être formés ne sont pas acides, mais qu'ils acquièrent leur acidité d'une manière indirecte. L'hypothèse postulée par Padh et al. (1989b) considère que le compartiment endosomal chez *Dictyostelium* est acidifié par fusion ou association avec d'autres vésicules prélysosomales riches en ATPase vacuolaire. Les vésicules responsables de l'acidification ont été appelées acidosomes. Le mécanisme d'acidification impliquant des acidosomes serait donc le responsable de l'acidification des compartiments sondés par le FITC-dextran. Un système d'acidification similaire a été décrit chez *Paramecium caudatum* (Allen et Fok, 1983) et il a été suggéré comme le mécanisme d'acidification du phagosome chez les macrophages (Lukacs et al., 1990).

Une stratégie parallèle pour l'étude de l'endocytose chez *Dictyostelium* est l'utilisation des techniques de fusion *in vitro* qui permettent la reconstitution des étapes



précises du transport vésiculaire de l'endocytose (Gruenberg et Howell, 1986 ; Gruenberg et al., 1989, pour revues Goda et Pfeffer, 1989 ; Gruenberg et Howell, 1989). Par exemple la reconstitution des étapes à partir de fractions subcellulaires provenant de mutants de l'acidification et de la souche parentale, permettront de détecter l'étape du trafic vésiculaire affectée dans les souches mutantes de *Dictyostelium*.

# **PUBLICATIONS**

## PUBLICATIONS

Klein, G., Bof, M., Gonzalez, C. & Satre, M. (1988) Dynamics of membrane proteins and cellular energetics, (Azzi, A., Latruffe, N., Gaudemer, Y. & Vignais, P.V., eds), Springer Verlag, Berlin. pp. 69-82. Fluid-Phase endocytosis and lysosomal enzyme excretion. Two facets of intracellular membrane traffic.

Gonzalez, C., Klein, G. & Satre, M. (1990). Caffeine, an inhibitor of endocytosis in *Dictyostelium discoideum* amoebae. J. Cell. Physiol. 144: 408-415 .

Gonzalez, C. and Satre, M. (1991). Endocytosis in *Dictyostelium discoideum* amoebae. Inhibition by cycloheximide and other inhibitors of protein synthesis. J. Cell Sci. 99: 535-543.

Bof, M., Brénot, F., Gonzalez, C., Klein, G., Martin, J-B. and Satre, M. *Dictyostelium discoideum* mutants resistant to the toxic action of methylene diphosphonate are defective in endocytosis. J. Cell Sci. (sous presse).

## COMMUNICATIONS AUX CONGRES.

Gonzalez, C., Satre, M. & Klein, G. (1988). Mesure et contrôle du pH endosomal chez l'amibe *Dictyostelium discoideum*. XV Forum des Jeunes Chercheurs, Orsay France.

Satre M., Gonzalez, C., Brénot, F., Bof, M. & Klein, G. (1989). Acidification du compartiment endosomal chez l'amibe *Dictyostelium discoideum*. Congrès de la Société de Chimie Biologique. Membranes et Activation Cellulaire. Grenoble France. p. 26.

Gonzalez, C., Klein, G. & Satre, M. (1990). Caffeine, an inhibitor of endocytosis in *Dictyostelium discoideum* amoebae. EMBO/NSF workshop. Molecular and Developmental Biology of *Dictyostelium*. Torino Italy. 10-15. p. 97.

Satre, M., Gonzalez, C., Bof, M., & Klein, G. (1990). Endocytosis in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. Inhibition of growth, fluid-phase pinocytosis and lysosomal enzyme secretion by vanadate and caffeine. Second European Workshop on Endocytosis. Institut Pasteur, Paris 1-5 octobre 1990.

Gonzalez, C. & Satre, M. (1991). Inhibition de l'endocytose chez l'amibe *Dictyostelium discoideum* par un inhibiteur de la synthèse protéique : la cycloheximide. Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire. Congrès de Bioénergétique et Membranes. Strasbourg France 16-17-18 septembre 1991.

Brénot, F., Klein, G., Gonzalez, C., Bof, M. & Satre M. (1991). Endocytosis pathways in *Dictyostelium* amoebae. Selection of mutants defective in fluid-phase pinocytosis which have an altered endosomal pH and a reduced lysosomal hydrolase content. Dictyostelium International Conference. Vancouver, August 20-25.

Gonzalez, C. & Satre, M. (1991). Endocytosis in *Dictyostelium discoideum* amoebae. Inhibition by cycloheximide and other inhibitors of protein synthesis. Dictyostelium International Conference. Vancouver, August 20-25.

# **REFERENCES**

# **BIBLIOGRAPHIQUES**

## Références bibliographiques

- Abe, T., Maeda, Y., & Iijima, T. 1988. Transient increase of the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration during chemotactic signal transduction in *Dictyostelium discoideum* cells. *Differentiation*. 39:90-96.
- Aboud-Pirak, E., Sargent, T., Otte-Slachmuylder, C., Abarca, J., Trouet, A., & Schneider, Y. J. 1988. Binding and endocytosis of a monoclonal antibody to a high molecular weight human milk fat globule membrane-associated antigen by cultured MCF-7 breast carcinoma cells. *Cancer Res.* 48: 3188-3196.
- Adams, C. J., Maurey, K. M., & Storrie, B. 1982. Exocytosis of pinocytic contents by chinese hamster ovary cells. *J. Cell Biol.* 93:632-637.
- Aeckerle, S., & Malchow, D. 1989. Calcium regulates cAMP-induced potassium ion efflux in *Dictyostelium discoideum*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1012:196-200.
- Aley, S. B., Cohn, Z. A., & Scott, W. A. 1984. Endocytosis in *Entamoeba Histolytica*. *J. Exp. Med.* 160:724-737.
- Allen, R. D., & Fok, A. K. 1983. Nonlysosomal vesicles (acidosomes) are involved in phagosome acidification in *Paramecium*. *J. Cell Biol.* 97:566-570.
- Anderson, R. G. W., & Orci, L. 1988. A view of acidic intracellular compartments. *J. Cell Biol.* 106:539-543.
- Anderson, R. G. W., & Pathak, R. K. 1985. Vesicles and cisternae in the trans Golgi apparatus of human fibroblasts are acidic compartments. *Cell.* 40:635-643.
- Antoni, F., Hrabak, A., & Csuka, I. 1986. Effect of emetine and chloroquine on phagocytic processes of rat macrophages. *Biochem. Pharmacol.* 35:2869-2874.
- Arnaud, M. J. 1987. The pharmacology of caffeine. *Prog. Drug. Res.* 31:273-313.
- Banno, Y., Sasaki, N., & Nozawa, Y. 1987. Secretion heterogeneity of lysosomal enzymes in *Tetrahymena pyriformis*. *Exp. Cell. Res.* 170:259-268.
- Beckers, C. J. M., & Balch, W. E. 1989. Calcium and GTP essential components in vesicular trafficking between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* 108:1245-1256.
- Berlin, R. D., & Oliver, J. M. 1980. Surface functions during mitosis. II quantitation of pinocytosis and kinetic characterization of the mitotic cycle with a new fluorescence technique. *J. Cell Biol.* 85:660-671.
- Berridge, M. J., & Galione, A. 1988. Cytosolic calcium oscillators. *FASEB J.* 2:3074-3082.

- Besterman, J. M., Airhart, J. A., Woodworth, R. C., & Low, R. B. 1981. Exocytosis of pinocytosed fluid in cultured cells: kinetic evidence for rapid turnover and compartmentation. *J. Cell Biol.* 91:716-727.
- Besterman, J. M., & Low, R. B. 1983. Endocytosis: a review of mechanism and plasma membrane dynamics. *Biochem. J.* 210: 1-13.
- Blomhoff, R., Nenseter, M. S., Green, M. H., & Berg, T. 1989. A multicompartmental model of fluid-phase endocytosis in rabbit liver parenchymal cells. *Biochem. J.* 262:605-610.
- Bof, M., Brénot, F., Gonzalez, C., Klein, G., Martin, J., & Satre, M. 1992. *Dictyostelium discoideum* mutants resistant to the toxic action of methylene diphosphonate are defective in endocytosis. *J. Cell Sci.* 101:(sous presse).
- Böhme, R., Bumann, J., Aeckerle, S., & Malchow, D. 1987. A high-affinity plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in *Dictyostelium discoideum*: Its relation to cAMP-induced  $\text{Ca}^{2+}$  fluxes. *Biochim. Biophys. Acta.* 904:125-130.
- Bonner, J. T. 1967. The cellular slime molds. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, 2nd ed. pp. 1-205.
- Bowman, E. J., Siebers, A., & Altendorf, K. 1988. Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:7972-7976.
- Bowser, R., & Murphy, R. F. 1990. Kinetics of hydrolysis of endocytosed substrates by mammalian cultured cells: early introduction of lysosomal enzymes into the endocytic pathway. *J. Cell. Physiol.* 143:110-117.
- Brenner, M., & Thoms, S. D. 1984. Caffeine blocks activation of cyclic AMP synthesis in *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Biol.* 101:136-146.
- Bush, J. M., & Cardelli, J. A. 1989. Processing, Transport, and Secretion of the lysosomal Enzyme Acid Phosphatase in *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* 264:7630-7636.
- Cabantchik, Z. I., Silfen, J., Firestone, R. A., Krugliak, M., Nissani, E., & Ginsburg, H. 1989. Effects of lysosomotropic detergents on the human malarial parasite *Plasmodium falciparum* in vitro culture. *Biochem. Pharmacol.* 38:1271-1277.
- Cain, C. C., & Murphy, R. F. 1988. A chloroquine-resistant swiss 3T3 cell line with a defect in late endocytic acidification. *J. Cell Biol.* 106:269-277.
- Cardelli, J. 1987. Defining the intracellular localization pathways followed by lysosomal enzymes in *Dictyostelium discoideum*. *Meth. Cell Biol.* 28:139-155.

- Cardelli, J. A., Richardson, J., & Miears, D. 1989. Role of acidic intracellular compartments in the biosynthesis of *Dictyostelium* lysosomal enzymes. *J. Biol. Chem.* 264: 3454-3463.
- Cardelli, J. A., Schatzle, J., Bush, J. M., Richardson, J., Ebert, D., & Freeze, H. 1990. Biochemical and genetic analysis of the biosynthesis, sorting, and secretion of *Dictyostelium* lysosomal enzymes. *Dev. Genet.* 11: 454-462.
- Chang, Y. Y. 1968. Cyclic 3', 5' adenosine monophosphate phosphodiesterase produced by the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Science.* 161:57-59.
- Clarke, M., & Kayman, S. C. 1987. The axenic mutations and endocytosis in *Dictyostelium*. *Meth. Cell Biol.* 28:157-176.
- Cohn, Z. A. 1966. The regulation of pinocytosis in mouse macrophages. I. Metabolic requirements as defined by the use of inhibitors. *J. Exp. Med.* 124:557-571.
- Colbaugh, P. A., Stookey, M., & Draper, R. K. 1989. Impaired lysosomes in a temperature-sensitive mutant of chinese hamster ovary cells. *J. Cell Biol.* 108:2211-2219.
- Crean, E. V., & Rossomando, E. F. 1979. Effects of sugars on glycosidase secretion in *Dictyostelium discoideum*. *J. Gen. Microbiol.* 110:315-322.
- Crête, P., & Landry, J. 1990. Induction of HSP27 phosphorylation and thermoresistance in Chinese hamster cells by arsenite, cycloheximide, A23187 and EGTA. *Radiation Res.* 121:320-327.
- D**aukas, G., & Zigmond, S. H. 1985. Inhibition of receptor-mediated but not fluid-phase endocytosis in polymorphonuclear leucocytes. *J. Cell Biol.* 101:1673-1679.
- De Belder, A. N., & Granath, K. 1973. Preparation and properties of fluorescein labelled dextrans. *Carbohydrate Res.* 30:375-378.
- De Chastellier, C., Quiviger, B., & Ryter, A. 1978. Observations on the functioning of the contractile vacuole of *Dictyostelium discoideum* with the electron microscope. *J. Ultrastruct. Res.* 62:220-227.
- De Chastellier, C., & Ryter, A. 1981. Calcium-dependent deposits at the plasma membrane of *Dictyostelium discoideum* and their possible relation with contractile proteins. *Biol. Cell.* 40:109-118.
- De Chastellier, C., & Ryter, A. 1982. Calcium deposits at the plasma membrane of *Dictyostelium discoideum* during phagocytosis and cell motility. *Biol. Cell.* 43:121-128.

- De Chastellier, C., & Ryter, A. 1977. Changes of the cell surface and of the digestive apparatus of *Dictyostelium discoideum* during the starvation period triggering. *J. Cell Biol.* 75:218-236.
- De Chastellier, C., Ryter, A., & Thilo, L. 1983. Membrane shuttle between plasma membrane phagosomes and pinosomes in *Dictyostelium discoideum* amoeboid cells. *Eur. J. Cell Biol.* 30:233-234.
- De Courcy, K., & Storrie, B. 1991. Osmotic swelling of endocytic compartments induced by internalized sucrose is restricted to mature lysosomes in cultured mammalian cells. *Exp. Cell Res.* 192:52-60.
- De Duve, C., Barsay, T., Poole, B., Trouet, A., Tulkens, P., & Van Hoof, F. 1974. Lysosomotropic agents. *Biochem. Pharmacol.* 23:2495-2531.
- De Luca, M., & Mc Elroy, W. D. 1974. Kinetics of the firefly luciferase catalysed reactions. *Biochemistry.* 13:921-925.
- Devreotes, P., Fontana, D., Klein, P., Sherring, J., & Theibert, A. 1987. Transmembrane signaling in *Dictyostelium*. *Meth. Cell Biol.* 28:299-331.
- Dimond, R. L., Burns, R. A., & Jordan, K. B. 1981. Secretion of lysosomal enzymes in the cellular slime mold, *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* 256:6565-6572.
- Draetta, G. 1990. Cell cycle control in eukaryotes: molecular mechanisms of cdc2 activation. *Trends Biochem. Sci.* 15:378-383.
- Draper, R. K., Chin, D., & Simon, M. I. 1980. The entry of diphtheria toxin into the mammalian cell cytoplasm: evidence for lysosomal involvement. *J. Cell Biol.* 87: 849-854.
- Drummond, I. A. S., & Chisholm, R. L. 1988. The effect of caffeine, adenosine and buffer ionic composition on the induction of cell-surface cAMP binding during starvation of *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Genet.* 9:293-301.
- Duffy, K. T. I., & Vogel, G. 1984. Linkage analysis of two phagocytosis receptors loci in *Dictyostelium discoideum*. *J. Gen. Microbiol.* 130:2071-2077.
- Dunn, W. A., Hubbard, A. L., & Aronson, N. N. J. 1980. Low temperature selectively inhibits fusion between pinocytic vesicle and lysosomes during heterophagy of 125I-asialofetuin by the perfused rat liver. *J. Biol. Chem.* 255:5971-5978.
- Ebert, D. L., Jordan, K. B., & Dimond, R. L. 1990. Lysosomal secretory mutants of *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell Sci.* 96:491-500.
- Ebert, D. L., Freeze, H. H., Richardson, J., Dimond, R. L., & Cardelli, J. A. 1989. A *Dictyostelium discoideum* mutant that missorts and oversecretes lysosomal enzyme precursors is defective in endocytosis. *J. Cell Biol.* 109:1445-1456.



- Endo, M. 1985. Regulation of calcium transport across muscle membranes. In : Current Topics in Membrane and Transport. A.E. Shamoo, ed. Academic Press, New York, Vol. 25, pp.181-230.
- Europe-Finner, G. N., & Newell, P. C. 1985. Calcium transport in the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. *FEBS Lett.* 186:70-74.
- Europe-Finner, G. N., & Newell, P. C. 1986. Inositol 1,4, 5-triphosphate induces calcium release from a non-mitochondrial pool in amoebae of *Dictyostelium*. *Biochim. Biophys. Acta.* 887:
- F**errari, V., & Cutler, D. J. 1990. Uptake of chloroquine by human erythrocytes. *Biochem. Pharmacol.* 39:753-762.
- Ferris, A. L., Brown, J. C., Dong Park, R., & Storrie, B. 1987. Chinese hamster ovary cell lysosomes rapidly exchange contents. *J. Cell Biol.* 105:2703-2712.
- Finney, R. E., Langtimm, C. J., & Soll, D. R. 1985. A characterization of the preaggregative period of *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Biol.* 110:157-170.
- Frehel, C., Chastellier, C., Lang, T., & Rastogi, N. 1986. Evidence of inhibition of fusion of lysosomal and prelysosomal compartments with phagosomes in macrophages infected with pathogenic *Mycobacterium avium*. *Infect. Immun.* 52:252-262.
- G**abay, J. E. 1988. Microbicidal mechanisms of phagocytes. *Curr. Opinion Immun.* 1:36-40.
- Geisow, M. J. 1984. Fluorescein conjugates as indicators of subcellular pH. A critical evaluation. *Exp. Cell Res.* 150: 29-35.
- Geisow, M. J., D'Arcy Hart, P., & Young, R. 1981. Temporal changes of lysosome and phagosome pH during phagolysosome formation in macrophages: studies by fluorescence spectroscopy. *J. Cell Biol.* 89:645-652.
- Geisow, M. J., & Evans, W. H. 1984. pH in the endosome. Measurements during pinocytosis and receptor-mediated endocytosis. *Exp. Cell Res.* 150:36-46.
- Gerish, G. 1987. Cyclic AMP and other signals controlling cell development and differentiation in *Dictyostelium*. *Annu. Rev. Biochem.* 56:853-879.
- Glynn, P. J. 1981. A quantitative study of the phagocytosis of *Escherichia coli* by myxamoebae of the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Cytobios.* 30:153-166.
- Goda, Y., & Pfeffer, S. R. 1989. Cell-free systems to study vesicular transport along the secretory and endocytic pathways. *FASEB J.* 3:2488-2495.

- Goldman, R. 1976. The effect of cytochalasin B and colchicine on concanavalin A induced vacuolation in mouse peritoneal macrophages. *Exp. Cell Res.* 99:385-394.
- Goldstein, J. L., Brown, M. S., Anderson, R. G. W., Russell, D. W., & Schneider, W. J. 1985. Receptor-mediated endocytosis : concepts emerging from the LDL receptor system. *Ann. Rev. Cell Biol.* 1:1-39.
- Gross, J. D., Bradbury, J., Kay, R. R., & Peacey, M. J. 1983. Intracellular pH and control of cell differentiation in *Dictyostelium discoideum*. *Nature.* 303:244-245.
- Gruenberg, J., Griffiths, G., & Howell, K. E. 1989. Characterization of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles in vivo and with an assay of vesicles fusion in vitro. *J. Cell Biol.* 108:1301-1316.
- Gruenberg, J., & Howell, K. E. 1986. Reconstitution of vesicle fusions occurring in endocytosis with a cell-free system. *EMBO J.* 5:3091-3101.
- Gruenberg, J., & Howell, K. E. 1989. Membrane traffic in endocytosis : insights from cell-free assays. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 5:453-481.
- Hagmann, J. 1986. Caffeine and heat shock induce adenylate cyclase in *Dictyostelium discoideum*. *EMBO J.* 5:3437-3440.
- Hagmann, J. 1988. Developmentally regulated compartmentalization of adenylate cyclase in *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell. Biochem.* 37:359-370.
- Hansen, S. H., Sandvig, K., & van Deurs, B. 1991. The preendosomal compartment comprises distinct coated and noncoated endocytic vesicle populations. *J. Cell Biol.* 113: 731-741.
- Hasilik, A., & Neufeld, E. 1980. Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblastes. synthesis as precursors of higher molecular weight. *J. Biol. Chem.* 255:4937-4945.
- Haylett, T., & Thilo, L. 1991. Endosome-lysosome fusion at low temperature. *J. Biol. Chem.* 266:8322-8327.
- Helenius, A., Mellman, I., Wall, D., & Hubbard, A. 1983. Endosomes. *Trends Biochem. Sci.* 8:245-250.
- Hohman, T., & Bowers, B. 1984. Hydrolase secretion is a consequence of membrane recycling. *J. Cell Biol.* 98:246-252.
- Hohman, T., & Bowers, B. 1985. Vacuolar pH is one factor that regulates hydrolase secretion. *Eur. J. Cell Biol.* 39: 475-480.

- Horwitz, M. A. 1988. Intracellular parasitism. *Curr. Opin. Immun.* 1:41-46.
- Horwitz, M. A., & Maxfield, F. R. 1984. *Legionella pneumophila* inhibits acidification of its phagosome in human monocytes. *J. Cell Biol.* 99:1936-1943.
- Hünseler, P., Scheidgen-Kleyboldt, G., & Tiedtke, A. 1987. Isolation and characterization of a mutant of *Tetrahymena thermophila* blocked in secretion of lysosomal enzymes. *J. Cell Sci.* 88:47-55.
- Inouye, K. 1989. Regulation of cytoplasmic pH in the differentiating cell types of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1012:
- Janssens, P. M. W., & Van Haastert, P. J. M. 1987. Molecular basis of transmembrane signal transduction in *Dictyostelium discoideum*. *Microbiol. Rev.* 51:396-418.
- Jessup, W., Shirazi, M. F., & Dean, R. T. 1983. Inhibition of some spontaneous secretory processes in macrophages and fibroblasts by ammonium chloride. *Biochem. Pharmacol.* 32: 2703-2710.
- Johansson, P., & Josefsson, J. O. 1984. Selective inhibition of calcium-stimulated cation-induced pinocytosis by starvation and inhibitors of protein synthesis in *Amoeba proteus*. *Exp. Cell Res.* 154:367-375.
- Kakiuchi, T., Watanabe, M., Hozumi, N., & Nariuchi, H. 1990. Differential sensitivity of specific and nonspecific antigen-presentation by B-cells to a protein synthesis inhibitor. *J. Immunol.* 145:1653-1658.
- Katz, E. R., & Sussman, M. 1972. Parasexual recombination in *Dictyostelium discoideum* : selection of stable diploid heterozygotes and stable haploid segregants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69:495-498.
- Khachatryan, L., Klein, C., & Howlett, A. 1987. Regulation of *Dictyostelium discoideum* adenylate cyclase by manganese and adenosine analogs. *Biochim. Biophys. Acta.* 927:235-246.
- Kinsella, B. A., Whitehead, M. C., Thomas, H. F., & Rossomando, E. F. 1986. Effect of the amino-acid analog hadacidin on intracellular membrane flow and the cell surface in *Dictyostelium discoideum*. A transmission and scanning electron microscope study. *Differentiation.* 31: 100-105.
- Klein, C. 1977. Changes in adenylate cyclase during differentiation of *Dictyostelium discoideum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1:17-20.
- Klein, G., Cotter, D. A., Martin, J. B., & Satre, M. 1989. Vanadate an inhibitor of growth development and endocytosis in *Dictyostelium discoideum* amoebae. *J. Cell Sci.* 94: 127-134.

- Klein, G., Martin, J. B., & Satre, M. 1988. Methylene diphosphonate, a metabolic poison in *Dictyostelium discoideum*.  $^{31}\text{P}$  NMR evidence for accumulation of adenosine 5' (beta, gamma- methylenetriphosphate) and diadenosine 5', 5'' -P<sub>1</sub>, P<sub>4</sub>-(P<sub>2</sub>,P<sub>3</sub>-methylenetetraphosphate). *Biochemistry*. 27: 1897-1901.
- Klein, G., & Satre, M. 1986. Kinetics of fluid phase pinocytosis in *Dictyostelium discoideum* amoebae. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 138:1146-1152.
- Klein, P., Theibert, A., & Devreotes, P. 1988b. Identification and ligand-induced modification of the cAMP receptor in *Dictyostelium*. *Meth.Enzymol.* 159:267-278.
- Knutson, V. P., Ronnett, G. V., & Lane, M. D. 1985. The effects of cycloheximide and chloroquine on insulin receptor metabolism. Differential effects on receptor recycling and inactivation and insulin degradation. *J. Biol. Chem.* 260: 14180-14188.
- Kornfeld, S., & Mellman, I. 1989. The biogenesis of lysosomes. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5:483-525.
- Kozma, S. C., Lane, H. A., Ferrari, S., Luther, H., Siegmann, M., & Thomas, G. 1989. A stimulated S6 kinase from rat liver: identity with the mitogen activated S6 kinase of 3T3 cells. *EMBO J.* 8:4125-4132.
- Krause, K., Pittet, D., Volpe, P., Pozzan, T., Meldolesi, J., & Lew, D. P. 1989. Calciosome, a sarcoplasmic reticulum-like organelle involved in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -handling by non-muscle cells : studies in human neutrophils and HL-60 cells. *Cell Calcium*. 10:351-361.
- Krieger, M., Kingsley, D., Sege, R., Hobbie, L., & Kozarsky, K. 1985. Genetic analysis of receptor-mediated endocytosis. *Trends Biochem. Sci.* 10:447-452.
- Ledger, P. W., & Tanzer, M. 1984. Monensin - a perturbant of cellular physiology. *Trends Pharmaceut. Sci.* 313-314.
- Lenhard, J. M., Kasperek, E., Moore, B., & Free, S. 1989. Developing *Dictyostelium discoideum* cells contain two distinct acid hydrolase-containing vesicles. *Exp. Cell Res.* 182:242-255.
- Liu, G., & Newell, P. 1988. Evidence that cAMP regulates myosin interactions with the cytoskeleton during chemotaxis of *Dictyostelium*. *J. Cell Sci.* 90:123-129.
- Löhden-Bendinger, U., & Bakker-Grunwald, T. 1990. Evidence for a vacuolar-type proton ATPase in *Entamoeba histolytica*. *Z. Naturforsch.* 45c:229-232.
- Loomis, W. F. 1975 *Dictyostelium discoideum*, A Developmental System. Academic Press, New York, pp. 1-214.

- Lukacs, G. L., Rotstein, O. D., & Grinstein, S. 1990. Phagosomal acidification is mediated by vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase in murine macrophages. *J. Biol. Chem.* 265: 21099-21107.
- Lydan, M. A., & O'Day, D. H. 1988. The role of intracellular Ca<sup>2+</sup> during early sexual development in *Dictyostelium discoideum*: Effects of LaCl<sub>3</sub>, Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, TMB-8, chlortetracycline and A23187 on cell fusion. *J. Cell Sci.* 90:465-473.
- Machy, P., Bizozzero, J. P., Reggio, H., & Leserman, L. 1990. Endocytosis and recycling of MHC-encoded class II molecules by mouse B lymphocytes. *J. Immunol.* 145:1350-1355.
- Maeda, Y. 1983. Axenic Growth of *Dictyostelium discoideum* wild-type NC-4 cells and its relation to endocytic ability. *J. Gen. Microbiol.* 129:2467-2473.
- Maeda, Y. 1988. Changes of endocytotic activities during the cell cycle of *Dictyostelium* cells. *Develop. Growth & Differ.* 30:15-24.
- Maeda, Y., & Kawamoto, T. 1986. Pinocytosis in *Dictyostelium discoideum* cells. A possible implication of cytoskeletal actin for pinocytic activity *Dictyostelium* discoideum cells. A possible . *Exp. Cell Res.* 164:516-526.
- Makarow, M. 1985. Endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*: internalization of  $\alpha$ -amylase and fluorescent dextran into cells. *EMBO J.* 4:1861-1866.
- Makarow, M., & Nevalainen, L. T. 1987. Transport of a fluorescent macromolecule via endosomes to the vacuole in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 104:67-65.
- Mann, S. K. O., & Firtel, R. A. 1987. Cyclic AMP regulation of early gene expression in *Dictyostelium discoideum*: Mediation via the cell surface cyclic AMP receptor. *Mol. Cell. Biol.* 7:458-469.
- Mann, S. K. O., Pinko, C., & Firtel, R. A. 1988. Control of early gene expression in *Dictyostelium*. *Dev. Genet.* 9: 337-350.
- Marnell, M. H., Stookey, M., & Draper, R. 1982. Monensin blocks the transport of diphtheria toxin to the cell cytoplasm. *J. Cell Biol.* 93:57-62.
- Marnell, M. H., Stookey, M., & Draper, R. 1982. Monensin blocks the transport of diphtheria toxin to the cell cytoplasm. *J. Cell Biol.* 93:57-62.
- Marsh, M., & Helenius, A. 1980. Adsorptive endocytosis of semliki forest virus. *J. Mol. Biol.* 142:439-454.

- Martin, J. B., Foray, M. F., Klein, G., & Satre, M. 1987. Identification of inositol hexaphosphate in  $^{31}\text{P}$  NMR spectra of *Dictyostelium discoideum* amoebae. Relevance to intracellular pH determination. *Biochim. Biophys. Acta.* 931: 16-25.
- Martin, S. J., Lennon, S. V., Bonham, A. M., & Cotter, T. G. 1990. Induction of apoptosis (programmed cell death) in human leukemic HL-60 cells by inhibition of RNA or protein synthesis. *J. Immunol.* 145:1859-1867.
- Matthews, L. M. J. 1977.  $\text{Ca}^{++}$  regulation in caffeine-derived microplasmodia of *Physarum polycephalum*. *J. Cell Biol.* 72: 502-505.
- Maxfield, F. R. 1982. Weak bases and ionophores rapidly and reversibly raise the pH of endocytic vesicles in cultures mouse fibroblasts. *J. Cell Biol.* 95:676-681.
- McNeil, P. L., Tanasugarn, L., Meigs, J. B., & Taylor, D. L. 1983. Acidification of phagosomes is initiated before lysosomal enzyme activity is detected. *J. Cell Biol.* 97: 695-702.
- McRobbie, S. J., & Newell, P. C. 1984. Chemoattractant-mediated changes in cytoskeletal actin of cellular slime moulds. *J. Cell Sci.* 68:139-151.
- Mellman, I., Fuchs, R., & Helenius, A. 1986. Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Ann. Rev. Biochem.* 55:663-700.
- Merion, M., Schlesinger, P., Brooks, R. M., Moehring, J. M., Moehring, T. J., & Sly, W. S. 1983. Defective acidification of endosomes in chinese hamster ovary cell mutant "cross-resistant" to toxins and viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80:5315-5319.
- Miller, A. J., Vogg, G., & Sanders, D. 1990. Cytosolic calcium homeostasis in fungi : roles of plasma membrane transport and intracellular sequestration of calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:9348-9352.
- Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, p.431.
- Milne, J. L., & Coukell, M. B. 1989. Identification of a high-affinity  $\text{Ca}^{2+}$  pump associated with endocytotic vesicles in *Dictyostelium discoideum*. *Exp. Cell Res.* 185:21-32.
- Milne, L., & Coukell, B. 1988. Isolation and characterization of a plasma membrane calcium pump from *Dictyostelium discoideum*. *Biochem. J.* 249:223-230.
- Mithieux, G., & Rousset, B. 1989. Identification of a lysosomal membrane protein which could mediate ATP-dependent stable association of lysosomes to microtubules. *J. Biol. Chem.* 264:4664-4668.

- Miyata, Y., Nishida, E., Koyasu, S., Yahara, I., & Sakai, H. 1989. Regulation by intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and cyclic AMP of the growth factor-induced ruffling membrane formation and stimulation of fluid-phase endocytosis and exocytosis. *Exp. Cell Res.* 181:454-462.
- Moya, M., Dautry-Varsat, A., Goud, B., Louvard, D., & Boquet, P. 1985. Inhibition of coated pit formation in Hep2 cells blocks the cytotoxicity of diphtheria toxin but not that of ricin toxin. *J. Cell Biol.* 101:548-559.
- Newell, P. C. 1982. Cell surface binding of adenosine to *Dictyostelium* and inhibition of pulsatile signalling. *FEBS Lett.* 13:417-421.
- North, M. J. 1983. Solute uptake by *Dictyostelium discoideum* and its inhibition. *J. Gen. Microbiol.* 129:1381-1386.
- O'Halloran, T. J., & Anderson, R. G. W. augusth, 1991. Creation of clathrin-deficient *Dictyostelium*. International Dictyostelium conference. The university of British Columbia, Vancouver, B.C. Canada.
- Ohkuma, S. 1989. Use of fluoresceine isothiocyanate-dextran to measure proton pumping in lysosomes and related organelles. *Meth. Enzymol.* 174:131-154.
- Ohkuma, S., & Poole, B. 1978. Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:3327-3331.
- Ohsumi, Y., & Anraku, Y. 1983. Calcium transport driven by a proton motive force in vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 258:5614-5617.
- Oka, J. A., & Weigel, P. H. 1989. The pathways for fluid phase and receptor mediated endocytosis in rat hepatocytes are different but thermodynamically equivalent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159:488-494.
- Orrenius, S., McConkey, D. J., Bellomo, G., & Nicotera, P. 1989. Role of  $\text{Ca}^{2+}$  in toxic cell killing. *Trends Pharmaceut. Sci.* 10:281-285.
- Padh, H., Lavasa, M., & Steck, T. L. 1989a. Characterization of vacuolar proton ATPase in *Dictyostelium discoideum*. *Biochem. Biophys. Acta.* 982:271-278.
- Padh, H., Lavasa, M., & Steck, T. L. 1991a. Endosomes are acidified by association with discrete proton-pumping vacuoles in *Dictyostelium*. *J. Biol. Chem.* 266:5514-5520.
- Padh, H., Lavasa, M., & Steck, T. L. 1989b. Prelysosomal acidic vacuoles in *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell Biol.* 108:865-874.

- Padh, H., Lavasa, M., & Steck, T. L. 1991b. Reconstitution of the association of endocytic vacuoles and acidosomes from *Dictyostelium*. *J. Biol. Chem.* 266:12123-12126.
- Palade, P., Dettbarn, C., Brunder, D., Stein, P., & Hals, G. 1987. Pharmacology of calcium release from sarcoplasmic reticulum. *J. Bioenerg. Biomembr.* 21:295-320.
- Pedersen, P. L., & Carafoli, E. 1987. Ion motive ATPases. I. ubiquity, properties, and significance to cell function. *Trends Biochem. Sci.* 12:146-150.
- Phaire-Washington, L., Silverstein, S. C., & Wang, E. 1980. Phorbol myristate acetate stimulates microtubule and 10-nm filament extension and lysosome redistribution in mouse macrophages. *J. Cell Biol.* 86:641-655.
- Pollard, H. B., Shindo, H., Creutz, C. E., Pazoles, C. J., & Cohen, J. S. 1979. Internal pH and state of ATP in adrenergic chromaffin granules determined by <sup>31</sup>P Nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 254: 1170-1177.
- Poole, B., & Ohkuma, O. 1981. Effect of weak bases on the intralysosomal pH in mouse peritoneal macrophages. *J. Cell Biol.* 90:665-669.
- Pratten, M. K., & Lloyd, J. B. 1979. Effects of temperature, metabolic inhibitors and some other factors on fluid-phase and adsorptive pinocytosis by rat peritoneal macrophages. *Biochem. J.* 180:567-571.
- Preston, A., Murphy, R., & Jones, E. W. 1987. Apparent endocytosis of fluorescein isothiocyanate-conjugates dextran by *Saccharomyces cerevisiae* reflects uptake of low molecular weight impurities, not dextran. *J. Cell Biol.* 105:1981-1987.
- Price, D. P., Nemenoff, R. A., & Avruch, J. 1989. Purification of a Hepatic S6 Kinase from Cycloheximide-treated Rats. *J. Biol. Chem.* 264:13825-13833.
- Raper, K. B. 1984. The dictyostelids. Princeton University press, Princeton, New Jersey, pp.1-453.
- Ratner, D. I., Pentz, W. H., & Pelletier, D. 1989. Prespore gene expression in *Dictyostelium* requires concomitant protein synthesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1008:71-78.
- Riezman, H., Chvatchko, Y., & Dulic, V. 1986. Endocytosis in yeast. *Trends Biochem. Sci.* 11:325-328.
- Rosenfeld, M. G., Kreibich, G., Popov, D., Kato, K., & Sabatini, D. D. 1982. Biosynthesis of lysosomal hydrolases: their synthesis in bound polysomes and the role of co- and post- translational processing in determining their subcellular distribution. *J. Cell Biol.* 93:135-143.



- Rossomando, E. F., Jahngen, E. G., Varnum, B., & Soll, D. R. 1981. Inhibition of a nutrient dependent pinocytosis in *Dictyostelium discoideum* by the amino-acid analog hadacidin. *J. Cell Biol.* 91:227-231.
- Rothman, J. H., Yamashiro, C. T., Raymond, C. K., Kane, P. M., & Stevens, T. H. 1989. Acidification of the lysosome-like vacuole and the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase are deficient in two yeast mutants that fail to sort vacuolar proteins. *J. Cell Biol.* 109:93-100.
- Rudnick, G. 1986. ATP-driven H<sup>+</sup> pumping into intracellular organelles. *Annu. Rev. Physiol.* 48:403-413.
- Ryter, A., & De Chastellier, C. 1977. Morphometric and cytochemical studies of *Dictyostelium discoideum* in vegetative phase. *J. Cell Biol.* 75:200-217.
- Sanders, E. J., & Bell, G. E. 1970. Inhibition of pinocytosis in *Amoeba proteus* by puromycin. *Exp. Cell Res.* 63:379-384.
- Sandvig, K., Olsnes, S., Petersen, O. W., & Van Deurs, B. 1987. Acidification of the cytosol inhibits endocytosis from coated pits. *J. Cell Biol.* 105:679-689.
- Sandvig, K., & Olsnes, S. 1980. Diphtheria toxin entry into cells is facilitated by low pH. *J. Cell Biol.* 87:828-832.
- Sandvig, K., & Van Deurs, B. 1990. Selective modulation of the endocytic uptake of ricin and fluid-phase markers without alteration in transferrin endocytosis. *J. Biol. Chem.* 265:6382-6388.
- Satre, M., Klein, G., & Martin, J. -. 1986. Intracellular pH control in *Dictyostelium discoideum*: a 31P-NMR analysis. *Biochimie.* 68:1253-1261.
- Satre, M., & Martin, J. B. 1985. 31P-Nuclear magnetic resonance analysis of the intracellular pH in the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 132:140-146.
- Schmid, S., Fuchs, R., Male, P., & Mellman, I. 1988. Two distinct subpopulations of endosomes involved in membrane recycling and transport to lysosomes. *Cell.* 52:73-83.
- Schuit, K. 1979. Evidence for active protein synthesis in phagocytosis by human monocytes. *J. Reticuloendothel. Soc.* 26:31-34.
- Seglen, P. O. 1983. Inhibitors of lysosomal function. *Meth. Enzymol.* 96:737-765.
- Sibley, L. D., Weidner, E., & Krahenbuhl, J. L. 1985. Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Nature.* 325:416-419.

- Siegert, F., & Weijer, C. 1989. Digital image processing of optical density wave propagation in *Dictyostelium discoideum* and analysis of the effects of caffeine and ammonia. *J. Cell Sci.* 93:325-335.
- Simms, H. H., Frank, M. M., Quinn, T. C., Holland, S., & Gaither, T. 1989. Studies on phagocytosis in patients with acute bacterial infections. *J. Clin. Invest.* 83:252-260.
- Singleton, C. K., Manning, S. S., & Feng, Y. 1988. Effect of protein synthesis inhibition on gene expression during early development of *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Cell. Biol.* 8: 10-16.
- St Pierre, Y., & Watts, T. H. 1990. MHC Class II-restricted presentation of native protein antigens by B cells is inhibitable by cycloheximide and brefeldin A. *J. Immunol.* 145:812-818.
- Steinman, R. M., Mellman, I. S., Muller, W. A., & Cohn, Z. A. 1983. Endocytosis and the recycling of plasma membrane. *J. Cell Biol.* 96:1-27.
- Sussman, M. 1987. Cultivation and synchronous morphogenesis of *Dictyostelium* under controlled experimental conditions. *Meth. Cell Biol.* 28:9-29.
- Swanson, J. 1989. Fluorescent labeling of endocytic compartments. *Meth. Cell Biol.* 29:137-149.
- Swanson, J. A., Yirinec, B. D., & Silverstein, S. C. 1985. Phorbol esters and horseradish peroxidase stimulate pinocytosis and redirect the flow of pinocytosed fluid in macrophages. *J. Cell Biol.* 100:851-859.
- Swanson, R. M., Taylor, D. L., & Bonner, J. T. 1981. Coated vesicles in *Dictyostelium discoideum*. *J. Ultrastructural Res.* 75:243-249.
- Thilo, L. 1985. Quantification of endocytosis-derived membrane traffic. *Biochim. Biophys. Acta.* 822:243-266.
- Thilo, L., & Vogel, G. 1980. Kinetics of membrane internalization and recycling during pinocytosis in *Dictyostelium discoideum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:1015-1019.
- Todorov, I. N. 1990. How cells maintain stability. *Scientific American.* 263:32-39.
- Tran, D., Carpentier, J., Sawano, F., Gorden, P., & Orci, L. 1987. Ligands internalized through coated or noncoated invaginations follow a common intracellular pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:7957-7961.
- Tuomikoski, T., Felix, M. A., Dorée, M., & Gruenberg, J. 1989. Inhibition of endocytic vesicle fusion in vitro by the cell-cycle control protein kinase cdc2. *Nature.* 342:942-945.

- Van Deurs, B., Röpke, C., & Thorball, N. 1984. Kinetics of pinocytosis studied by flow cytometry. *Eur. J. Cell Biol.* 34:96-102.
- Vogel, G. 1983. *Dictyostelium discoideum* as a model system to study recognition mechanisms in phagocytosis. *Meth. Enzymol.* 98:421-430.
- Vogel, G. 1987. Endocytosis and recognition mechanisms in *Dictyostelium discoideum*. *Meth. Cell Biol.* 28:129-137.
- Vogel, G., Thilo, L., Schwarz, H., & Steinhart, R. 1980. Mechanism of phagocytosis in *Dictyostelium discoideum*: phagocytosis is mediated by different recognition sites as disclosed by mutants with phagocytotic properties. *J. Cell Biol.* 86:456-465.
- Volpe, P., Krause, K., Hashimoto, S., Zorzato, F., Pozzan, T., Meldolesi, J., & Lew. D. 1988. "Calciosome", a cytoplasmic organelle: the inositol 1,4, 5-triphosphate-sensitive  $Ca^{2+}$  store of nonmuscle cells? *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:1091-1095.
- Wagner, R., Rosenberg, M., & Estensen, R. 1971. Endocytosis in chang liver cells. Quantitation by sucrose-3H uptake and inhibition by cytochalasin B. *J. Cell Biol.* 50:804-817.
- Wang, M., Van Haastert, P. J. M., & Schaap, P. 1986. Multiple effects of differentiation-inducing factor on prespore differentiation and cyclic-AMP signal transduction in *Dictyostelium*. *Differentiation.* 33:24-28.
- Ward, S. 1988. Mechanisms of chloroquine resistance in malarial chemotherapy. *Trends Pharmaceut. Sci.* 9:241-246.
- Warren, G. 1985. Membrane traffic and organelle division. *Trends Biochem. Sci.* 10:439-443.
- Watts, D. J., & Ashworth, J. M. 1970. Growth of myxamoebae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochem. J.* 119:171-174.
- Weigel, P. H., & Oka, J. 1981. Temperature dependence of endocytosis mediated by the asialoglycoproteine receptor in isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 256:2615-2617.
- Wessling-Resnick, M., & Braell, W. 1990. Characterization of the mechanism of endocytic vesicle fusion in vitro. *J. Biol. Chem.* 265:16751-16759.
- Wileman, T., Harding, C., & Stahl, P. 1985. Receptor-mediated endocytosis. *Biochem. J.* 232:1-14.

Williams, K. L., Kessin, R. H., & Newell, P. C. 1974a. Genetics of growth in axenic medium of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. *Nature*. 247:142-143.

Williams, K. L., Kessin, R. H., & Newell, P. C. 1974b. Parasexual genetics in *Dictyostelium discoideum* : mitotic analysis of acriflavin resistance and growth in axenic medium. *J. Gen. Microbiol.* 84:59-69.

**Y**amashiro, D. J., & Maxfield, F. R. 1987. Kinetics of endosome acidification in mutant and wild-type chinese hamster ovary cells. *J. Cell Biol.* 105:2713-2721.

Yamashiro, D. J., & Maxfield, F. R. 1988. Regulation of endocytic processes by pH. *Trends Pharmaceut. Sci.* 9: 190-193.

# ATTESTATION

Le Président de l'Université Joseph Fourier - Grenoble I, soussigné,  
certifie que

M onsieur GONZALEZ-HERNANDEZ Carlos

Né(e) le 22 Juin 1961 à MEXICO (Mexique)

inscrit(e) à l'Université Joseph Fourier - Grenoble I sous le numéro

8703221 a soutenu le 20 Décembre 1991, conformément

aux règlements, la thèse : Etude des mécanismes de l'endocytose chez

Dictyostelium discoideum. Caractérisation des effets inhibiteurs de la

caféine et de la cycloheximide. Analyse du pH endosomal.

devant le jury composé de :

Président : Monsieur PELMONT Jean, Professeur. -

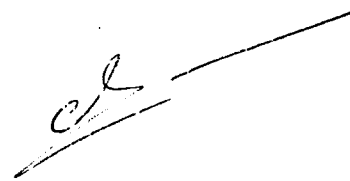
Membres : M. VIGNAIS P., Prof. - M. PHILIPPOT J., Dir. de Rech. -

M. SATRE M., Dir. de Rech. -

Le jury a accordé à l'intéressé(e), le grade de Docteur de  
l'Université Joseph Fourier - Grenoble I, spécialité BIOLOGIE,  
avec la mention TRES HONORABLE pour en jouir avec les droits et  
prérogatives qui y sont attachés par les lois, décrets et règlements.

Délivrée à Grenoble, le 5 mars 1992

Le Président de l'Université



A. NEMOZ